

Aus dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**cAMP-unabhängige Regulation von Opioidrezeptoren
durch Adenylatzyklen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
an der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Anna Edith Seuberth
aus Eichstätt

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer
Korreferentin: Prof. Dr. C. Deeg

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

„Forsche, denke nach, kombiniere,
übe deine Imagination daran
und setze die Kreatur an den Platz,
der ihr zugewiesen ist.“

Sepher Jesira

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	5
1.1	Opioiderge Wirkmechanismen	5
1.1.1	Opioidrezeptoren	5
1.1.2	G-Proteine	7
1.1.3	Effektorsysteme	8
1.1.3.1	Adenylatzyklasen	8
1.1.3.2	Phospholipase C	10
1.1.3.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	11
1.2	Mechanismen der chronischen Opioidwirkung	12
1.2.1	Toleranz	12
1.2.1.1	Rezeptorphosphorylierung	13
1.2.1.2	Rezeptorendozytose	13
1.2.1.3	Rezeptorrecycling und –degradation	13
1.2.2	Abhängigkeit	15
1.2.3	Sensibilisierung der Adenylatzyklase	15
1.3	cAMP-unabhängige Funktionen der Adenylatzyklase	16
1.4	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.2.	Zellmodelle	18
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.1.1	Kultierung von COS-7 Zellen	19
2.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	20

2.2.2	Transfektion von COS-7 Zellen	20
2.2.2.1	Verwendete Plasmide	21
2.2.2.2	Bestimmung der Hygromycinsensitivität von COS-7 Zellen	21
2.2.2.3	Lipid-Komplex-Transfektion	21
2.2.2.4	Calcium-Phosphat-Copräzipitation	22
2.2.3	Herstellung stabiler COS μ -Klone	22
2.2.4	Opioidbehandlung	23
2.3	Herstellung der Adenylatzyklasekonstrukte	24
2.3.1	Agarosegel-Elektrophorese	24
2.3.2	Primerdesign	25
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.3.4	Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen oder Gelen	28
2.3.5	Restriktionsverdau	28
2.3.6	Ligation	29
2.3.7	Herstellung kompetenter Bakterien	29
2.3.8	Transformation von Bakterien	30
2.3.9	Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	30
2.3.10	Konservierung von Bakterien in Glycerol	32
2.4	Bestimmung von Opioidrezeptoren	32
2.4.1	Membranpräparation	33
2.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry	33
2.4.3	Radioligandenbindung	34
2.4.3.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d	35
2.4.3.2	Bestimmung der Rezeptorendichte B_{max}	36
2.4.4	Immunfluoreszenz	37
2.5	Bestimmung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion	37
2.5.1	GTP γ S-Bindung	37
2.6	Bestimmung der Effektorenregulation	38
2.6.1	Adenylatzyklaseaktivität	38

2.6.1.1	Intrazelluläre cAMP-Akkumulation	39
2.6.1.2	Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität	40
2.6.1.3	Bestimmung von cAMP im RIA	41
2.6.2	Bestimmung der MAPK Aktivierung und der Translokation von Signalproteinen im Westernblot	43
2.6.2.1	Herstellung von SDS-Proben	43
2.6.2.2	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	44
2.6.2.3	SDS-Gelelektrophorese	44
2.6.2.4	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen	45
2.6.2.5	Immunchemische Proteindetektion	46
2.6.2.6	Chemilumineszenz	47
2.7	Auswertung der Ergebnisse	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Zellsystem	48
3.1.1	Etablierung stabiler COS μ -Klone	48
3.1.1.1	Herstellung von Plasmid pCEP- μ OR	48
3.1.1.2	Bestimmung der Sensitivität von COS μ -Zellen gegenüber Hygromycin	49
3.1.1.3	Transfektion von COS-7 Zellen	49
3.1.1.4	Selektion	49
3.1.1.5	Subklonierung	49
3.1.1.6	Bestimmung der Rezeptorendichte mittels Radioligandenbindung	50
3.1.1.7	Darstellung der Rezeptoren mittels Immunfluoreszenz	50
3.1.1.8	Pharmakologische Charakterisierung des μ -Opioidrezeptors	51
3.1.2	Herstellung der Adenylatzyklasekonstrukte	53
3.1.2.1	Auswahl der Primer	53
3.1.2.2	PCR und Ligation	54
3.1.2.3	Kontrolle der Konstrukte mittels Restriktionsverdau	55
3.1.2.4	Expression der Konstrukte in COS-7 Zellen	55

3.2	Funktionelle Charakterisierung der Adenylatzyklasekonstrukte	57
3.2.1	Enzymatische Aktivität der Konstrukte	57
3.2.2	Nachweis von „scavenger“- und „feedback“-Funktionen der Konstrukte	59
3.3	Regulation der μ-Opioid-Rezeptor-Funktion durch die Adenylatzyklasekonstrukte	61
3.3.1	GTP γ S-Bindung	61
3.3.2.1	Bestimmung der maximalen G-Protein-Aktivierung	61
3.3.2.2	Effizienz der Rezeptor/G-Protein-Interaktion	62
3.3.2	ERK1/2-Aktivierung	65
3.3.3	Rezeptorinternalisierung	67
3.3.4	Umverteilung von GRK2 und β -Arrestin 1	69
3.3.4.1	GRK2-Translokation	70
3.3.4.2	β -Arrestin 1-Translokation	71
4.	Diskussion	74
5.	Zusammenfassung	82
6.	Summary	83
7.	Literaturverzeichnis	84
8.	Anhang	96
8.1	Abkürzungsverzeichnis	96
8.2	Abbildungsverzeichnis	98
8.3	Bezugsquellen	100
8.4	Danksagung	102

1. EINLEITUNG

Morphin und seine Derivate werden zur Stoffgruppe der stark wirksamen Analgetika gezählt, die ihre Funktion über spezifische Rezeptoren vermitteln. Obwohl Opioide zur Behandlung starker Schmerzzustände unerlässlich sind, kann ihr therapeutischer Nutzen nach längerfristiger Anwendung durch die Ausbildung von Toleranz, Abhängigkeit und Sucht stark eingeschränkt werden. Die den chronischen Opioidwirkungen zugrunde liegenden neurobiologischen Veränderungen sind mannigfaltig und umfassen Adaptationen auf übergeordneter funktioneller, zellulärer und molekularer Ebene (Koob und Nestler, 1997). Die zellulären Veränderungen sind dabei durch eine ausgesprochene Plastizität opioiderger Signalmechanismen charakterisiert. So geht Toleranz oftmals mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Rezeptoren einher, wohingegen die Entstehung von Abhängigkeit mit kompensatorischen Mechanismen auf Ebene der den Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden in Verbindung gebracht wird (von Zastrow, 2004). Dem cAMP „second messenger“ System kommt dabei eine besondere Rolle zu, da es nicht nur an der Ausbildung physischer Entzugssymptome beteiligt ist, sondern auch durch Eingriff in die Genregulation längerfristige Veränderungen in der Zellfunktion bewirken kann (Watts und Neve, 2005). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung cAMP unabhängiger Einflüsse der Adenylatzyklase auf die Regulation von Opioid-rezeptoren nach akuter und chronischer Morphinbehandlung in einem rekonstituierten Zellsystem. Die Ergebnisse zeigen, dass Adenylatzyklasen unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität noch über weitere regulatorische Eigenschaften verfügen, die über „feedback“ Mechanismen auf die Regulation der Rezeptorsensitivität Einfluss nehmen können.

1.1 Opioiderge Wirkmechanismen

Analgetika vom Morphintyp vermitteln ihre Wirkung über Interaktion mit Rezeptoren der endogenen, peptidergen Opioidsysteme. Diese umfassen die Endorphine, Dynorphine und Endomorphine (Hughes et al., 1975; Pasternak et al., 1976; Zadina et al., 1999).

1.1.1 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren werden in spezifischen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert und sind an der Modulation der Schmerztransmission sowie –

perzeption maßgeblich beteiligt (Reisine und Bell, 1993). Auf molekularer Ebene stellen sie typische G-Protein gekoppelte Rezeptoren dar, die durch sieben transmembrane Domänen, einen extrazellulär gelegenen N-Terminus und einen zytosolischen C-Terminus charakterisiert sind (Law et al., 2000). Anhand ihrer Primärstruktur werden Opioid-rezeptoren in δ -, κ - und μ -Typen eingeteilt (Evans et al., 1992; Chen et al., 1993; Yasuda et al., 1993), die auf pharmakologischer Ebene mit Hilfe selektiver Liganden wiederum in mehrere Subtypen unterteilt werden können (Goldstein und Naidu, 1989; Standifer und Pasternak, 1997). Außer an den für die Ligandenbindung verantwortlichen extrazellulären Domänen unterscheiden sich die einzelnen Rezeptortypen vor allem im Bereich der dritten intrazellulären Schleife und des distalen C-Terminus, die maßgeblich an der Aktivierung assoziierter G-Proteine sowie der Agonist vermittelten Regulation der Rezeptorsensitivität beteiligt sind (Law et al., 2000; Waldhoer et al., 2004). Da in der vorliegenden Arbeit der für die Ausbildung von Abhängigkeit verantwortliche μ -Opioid-rezeptor verwendet wurde, beziehen sich alle nachfolgenden Ausführungen auf diesen Rezeptortyp. Abbildung 1 zeigt halbschematisch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranen Domänen:

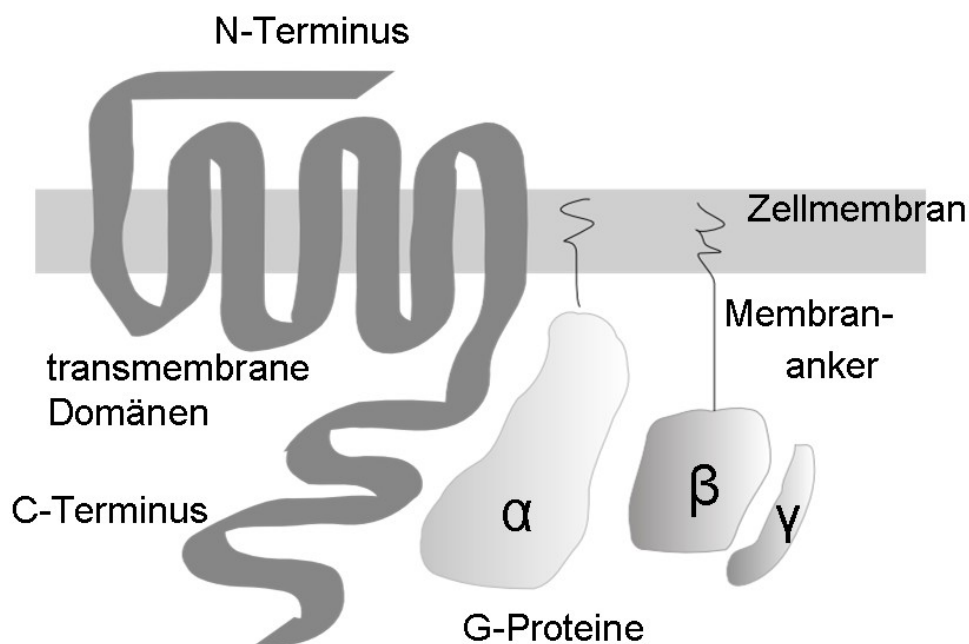


Abb. 1: Halbschematische Darstellung eines Rezeptors mit sieben transmembranen Domänen, der in der Zellmembran liegt. Neben dem C-Terminus sind die α -, β - und γ -Untereinheit des G-Proteins dargestellt. Die Graphik wurde mit dem Computerprogramm Inkscape, Free Software Foundation, Inc., erstellt.

1.1.2 G-Proteine

Opioiddrezeptoren vermitteln ihre Information auf intrazelluläre Effektorsysteme über die Aktivierung von Guaninukleotid bindenden Proteinen, die als G-Proteine bezeichnet werden (Gilman, 1987). Diese stellen heterotrimere Polypeptide dar, die aus einer $G\alpha$ -Untereinheit und einem funktionellen $G\beta\gamma$ -Dimer bestehen. Im Ruhezustand ist an die $G\alpha$ -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, das nach Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Die mit dem Nukleotidaustausch einhergehende Konformationsänderung führt zur Dissoziation der aktivierten $G\alpha$ -Untereinheit vom $G\beta\gamma$ -Dimer, wodurch zwei eigenständige Signalmoleküle entstehen, die wiederum nachfolgend ihre jeweiligen Effektorsysteme regulieren (Neer, 1994; Harrison et al., 1998). Die Signalübertragung wird nach Hydrolyse von GTP zu GDP durch die intrinsische Guanosintriphosphatase (GTPase)-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit und Reassoziierung zum Heterotrimer beendet. Die G-Proteine stehen nun wieder für einen erneuten Aktivierungszyklus zur Verfügung (Neer, 1994). Der G-Protein-Zyklus kann durch Interaktion der GTP-beladenen $G\alpha$ -Untereinheit mit so genannten „GTPase accelerating proteins“ (GAP), die zur Gruppe der „regulators of G protein signaling“ (RGS) gehören, erheblich beschleunigt werden, was zu einer Ab-

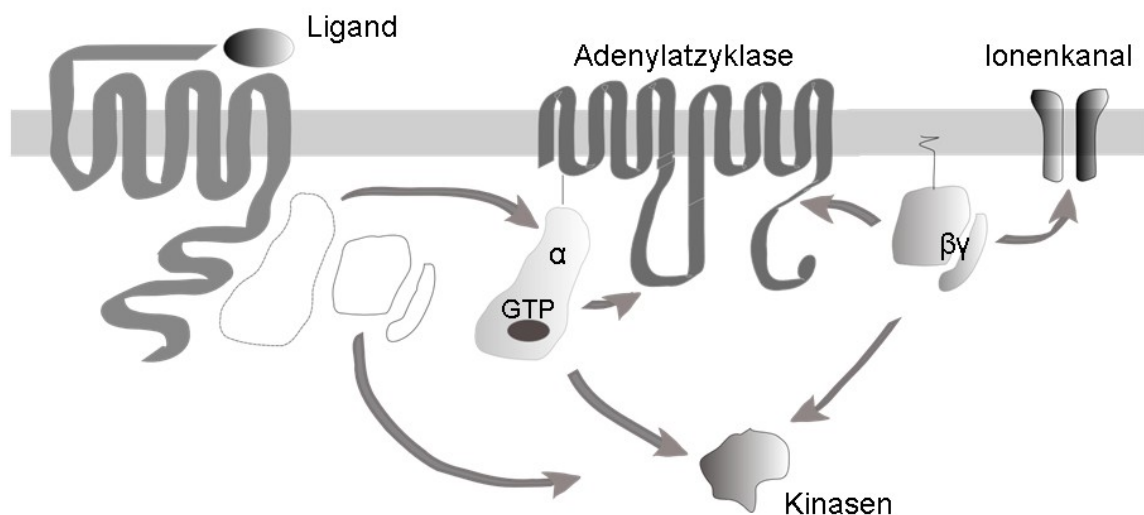


Abb. 2: Rezeptor-vermittelte Regulation von Effektorsystemen. Nach Bindung eines Liganden wird in der $G\alpha$ -Untereinheit GDP durch GTP ersetzt, woraufhin dieses vom $G\beta\gamma$ -Dimer abdissoziiert und beide Signalmoleküle ihre entsprechenden Effektoren, wie z.B. Adenylatzyklase, diverse Proteinkinasen oder Ionenkanäle, regulieren können. Die Graphik wurde mit dem Computerprogramm Inkscape, Free Software Foundation, Inc., erstellt.

schwächung bis hin zum Sistieren der Signalübertragung führt (Hepler, 1999). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die G-Protein vermittelte Regulation intrazellulärer Effektorsysteme nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden.

Auf molekularer Ebene zeichnet sich die Familie der heterotrimeren G-Proteine durch eine ausgesprochene Vielfalt aus, wobei derzeit 23 unterschiedliche Isoformen der $G\alpha$ -, 5 der $G\beta$ - und 14 der $G\gamma$ -Untereinheit bekannt sind (Gudermann et al., 1996). Anhand der funktionellen Eigenschaften ihrer $G\alpha$ -Untereinheiten werden G-Proteine in vier Familien eingeteilt:

Familie	G-Proteine
G_s	$G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$
G_i	$G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$
G_q	$G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{16}$
G_{12}	$G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$

Tab. 1: Einteilung der G-Proteine nach Gudermann et al. (1996).

Je nach Ausstattung einer Zelle mit G-Proteinen können Opioidrezeptoren ihre Funktion sowohl über inhibitorische G-Proteine als auch über Mitglieder der G_q -Familie vermitteln (Laugwitz et al., 1993; Lee et al., 1998; Ho et al., 2001). Die Signalübertragung durch inhibitorische G-Proteine, mit Ausnahme derjenigen von G_z , kann durch Pertussistoxin-katalysierte ADP-Ribosylierung blockiert werden (Ho und Wong, 2001).

1.1.3 Effektorsysteme

1.1.3.1 Adenylatzyklen

Adenylatzyklen (AC; EC 4.6.1.1) stellen integrale Membranproteine dar und besitzen katalytische Aktivität, die Adenosintriphosphat (ATP) in den intrazellulären „second messenger“ zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP) umwandelt (Taussig und Gilman, 1995). In Säugerzellen wurden bis jetzt neun verschiedene Isoformen (AC I – AC

IX) identifiziert, die alle durch $G\alpha_s$ und das Diterpen Forskolin stimuliert werden, wobei die Effekte bei der Adenylatzyklase IX nur schwach ausgebildet sind (Insel und Ostrom, 2003). Sie unterscheiden sich jedoch maßgeblich in ihrer Selektivität gegenüber sekundären Regulatoren wie inhibitorischen $G\alpha$ -Untereinheiten, $G\beta\gamma$ -Dimere, Proteinkinasen A und C (PKA; PKC), Raf-1 sowie Calcium/Calmodulin (Hanoune und Defer, 2001; Sunahara und Taussig, 2002). Darüber hinaus ist eine ursprünglich im Hoden identifizierte lösliche Adenylatzyklase bekannt (Buck et al., 1999), auf die jedoch hier nicht näher eingegangen wird.

Adenylatzyklasten stellen pseudosymmetrisch aufgebaute Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 120-180 kDa dar, die aus je zwei hydrophoben Plasmamembrandomänen (M1 und M2) und zwei zytoplasmatischen Abschnitten (C1 und C2) aufgebaut sind. Das katalytische Zentrum wird dabei von einer Kontaktstelle der C1- mit der C2-Domäne gebildet (Tesmer und Sprang, 1998). Aufgrund der pseudosymmetrischen Struktur und der Lage des katalytischen Zentrums erklärt sich die bimodale Regulation der enzymatischen Aktivität nach Bindung verschiedener Regulatoren an die C1- und C2-Domäne (Taussig und Gilman, 1995). Die Struktur der Adenylatzyklasten ist in Abbildung 3 abgebildet:

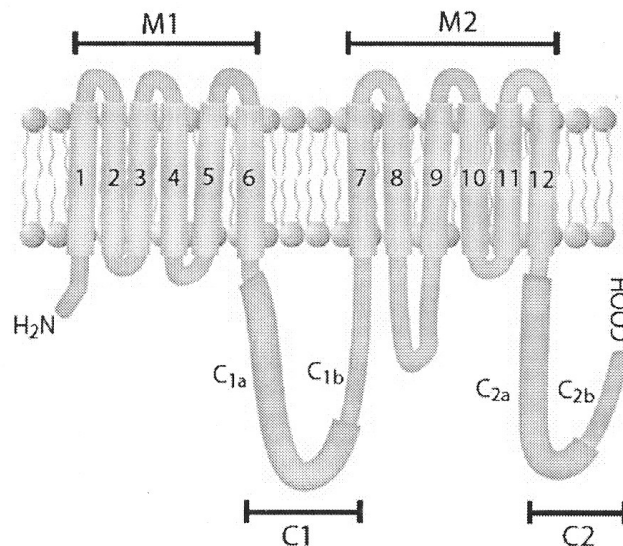


Abb. 3: Halbschematische Darstellung der Struktur von Adenylatzyklasten. Erkennbar sind die aus jeweils sechs transmembranen Domänen bestehenden M1 und M2 Abschnitte sowie die zytoplasmatischen Domänen C1 und C2, die jeweils wiederum in je zwei Abschnitte (C1/2a und C1/2b) unterteilt ist. (Beazely und Watts, 2006).

Die Regulation des intrazellulären cAMP Gehaltes durch Opiode ist äußerst komplex und wird durch die Ausstattung der Zelle mit den verschiedenen Isoformen der Adenylat-

zyklase bestimmt. In der Regel führt die Aktivierung eines Opioidrezeptors über die direkte Bindung inhibitorischer $G\alpha$ -Untereinheiten an die intrazelluläre C1-Domäne zu einer Hemmung der Isoformen AC I, V und VI (Dessauer et al., 1998). Des weiteren können die von inhibitorischen G-Proteinen freigesetzten $G\beta\gamma$ -Dimere in Anwesenheit von $G\alpha_s$ die Aktivität der Adenylatzyklasten II und IV stimulieren (Gao und Gilman, 1991; Taussig et al., 1993a) oder die der Isoform AC I hemmen (Taussig et al., 1993b). Die G-Protein regulierte enzymatische Aktivität kann je nach Isoform darüber hinaus durch eine Reihe zusätzlicher Faktoren weiter moduliert werden, wodurch eine Kommunikation mit anderen Effektorsystemen ermöglicht wird (Sunahara et al., 1996; Tan et al., 2001). So führt eine durch PKA vermittelte Phosphorylierung der Adenylatzyklase V und VI zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität dieser Isoformen (Iwami et al., 1995; Chen et al., 1997). Eine PKC vermittelte Phosphorylierung erhöht dagegen die Sensitivität der Isoform AC V gegenüber einer Stimulation mit $G\alpha_s$ (Kawabe et al., 1994), während die der AC VI gehemmt wird (Lai et al., 1997). Allein für die Adenylatzyklase IX ist bisher keine Regulation durch Opioide nachgewiesen worden (Avidor-Reiss et al., 1996).

Das gebildete cAMP reguliert als klassischer „second messenger“ über PKA vermittelte Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threonin-haltiger Konsensusregionen die Funktion einer Vielzahl von Proteinen wie Rezeptoren, intrazellulären Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren, und kann so die Zellfunktion nachhaltig beeinflussen (Pierce et al., 2002).

1.1.3.2 Phospholipase C

Die Phospholipase C (PLC) kann durch Bindung aktivierter $G\alpha$ -Untereinheiten der Gq/11 Familie sowie von freien $G\beta\gamma$ -Dimeren aktivierter PTX-sensitiver G-Proteine stimuliert werden (Miyamae et al., 1993; Tsu et al., 1995; Ueda et al., 1995). Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in zwei Signalmoleküle, dem Inositoltriphosphat (IP_3) und dem Diacylglycerol (DAG). IP_3 steigert die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG die enzymatische Aktivität der PKC reguliert. Neben der Regulation einer Vielzahl intrazellulärer Calcium/ Calmodulin-abhängiger Signalkaskaden kann die PKC im Sinne einer Rückkopplung auch in die Funktion des Opioidrezeptors selbst eingreifen (Berridge, 1993; Chakrabarti et al., 1998; Law et al., 2000).

1.1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) stellen eine Familie an zytosolischen Tyrosinkinassen dar, die nach ihrer Aktivierung in den Zellkern wandern und dort durch Vermittlung verschiedener Transkriptionsfaktoren in die Genregulation und somit in die Zelldifferenzierung und -proliferation eingreifen. Sie wird eingeteilt in die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK), Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) und p-38-Kinasen, wobei in einer einzelnen Zelle mehrere alternative Signalwege bestehen können (Seger und Krebs, 1995). MAP-Kinasen werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren, z.B. epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), über die Stimulation Tyrosinkinase-assoziiierter Rezeptoren (RTK) aktiviert (Pawson, 1995). Die Aktivierung der ERKs erfolgt dabei über eine komplexe, in allen Zellen identische Signalkaskade, die verschiedene Phosphorylierungsschritte durch unterschiedliche Kinasen umfasst (Cobb und Goldsmith, 1995). So bewirkt die Aktivierung von RTKs eine Phosphorylierung der cRaf-1 Kinase, die wiederum durch Phosphorylierung die MAP-Kinase-Kinase MEK aktiviert. Die aktivierte MEK phosphoryliert und aktiviert schließlich die ERK1/2 (Crespo et al., 1994). Neben RTKs sind auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Lage, die ERK1/2 zu aktivieren, indem sie auf verschiedenen Ebenen in die Signalkaskade eingreifen können. Für den Opioidrezeptor am besten untersucht ist die durch ihn vermittelte Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1 (p44^{MAPK}; 44kDa) und ERK2 (p42^{MAPK}; 42kDa). Die Aktivierung der MAPK-Kaskade geschieht in diesem Fall über mehrere redundante Signalwege, die vom G-Protein gekoppelten Rezeptor über PKC, c-Src bzw. Transaktivierung von RTKs laufen können. Sie münden in die Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras, welches in einer Phosphorylierungskaskade über Raf-1, MEKK und MEK schließlich ERK1/2 aktivieren können (Liebmann, 2001). Neuere Untersuchungen konnten der ERK1/2 zudem weitere Funktionen zuschreiben, unter anderem die direkte Phosphorylierung von Opioidrezeptoren (Kramer et al., 2000; Schmidt et al., 2000) und β -Arrestin 1, wobei letzteres an der Desensibilisierung und Internalisierung des Opioidrezeptors beteiligt ist (Lin et al., 1997).

1.2 Mechanismen der chronischen Opioidwirkung

Wird ein Rezeptor über längere Zeit durch einen Liganden aktiviert, so führt dies zu vielfältigen Adaptionen sowohl am Rezeptor selbst als auch auf Ebene der den Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden. Dies kommt bei der Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit zum Ausdruck.

1.2.1 Toleranz

Unter Toleranz versteht man die Abschwächung der akuten Pharmakonwirkung nach seiner längerfristigen Anwendung. Somit muss die Dosis erhöht werden, um die ursprüngliche Wirkung aufrecht zu erhalten (Collier, 1984). Auf zellulärer Ebene entsteht Toleranz gegenüber Opioiden vor allem durch eine Abnahme der Empfindlichkeit und der Anzahl der für die Liganden an der Zelloberfläche zugänglichen Rezeptoren (Johnson und Fleming, 1989). Dabei befindet sich die Gesamtmenge der an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren in einem kontinuierlichen Gleichgewicht aus Endozytose und Recycling (Szerkeres et al., 1998). Nach längerfristiger Einwirkung eines Agonisten verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten der Endozytose, wodurch der Anteil der an der Oberfläche befindlichen Rezeptoren geringer wird. Dieser Vorgang wird auch als Rezeptorinternalisierung bezeichnet. Die an der Rezeptorinternalisierung beteiligten Mechanismen wurden am Beispiel des β 2-Adrenozeptors detailliert untersucht und nachfolgend auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen (Ferguson et al., 1996; Hausdorff et al., 1990). Hinsichtlich der Opioidrezeptoren zeigten sich dabei deutliche Spezies- und Typ-spezifische Unterschiede im Internalisierungsverhalten. Während δ - und κ -Opioidrezeptor des Menschen bereits nach kurzzeitiger Agonistexposition mit einer ausgeprägten Internalisierung reagieren (Li et al., 1999; Zhang et al., 1999), führt auch eine längerfristige Aktivierung von μ - und κ -Opioidrezeptoren der Ratte selbst mit hoch potenten Liganden nur zu einer geringfügigen Abnahme der Oberflächenrezeptoren (Koch et al., 1998). Das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung ist auch Ligandenabhängig. So können verschiedene Agonisten am gleichen Rezeptor eine unterschiedlich starke Internalisierung bewirken. So besitzen das Alkaloid Etorphin und die endogenen Opioide eine ausgeprägte Fähigkeit, den δ - und μ -Opioidrezeptor zu internalisieren. Im Gegensatz dazu ist Morphin trotz agonistischer Wirkung nicht in der Lage, diese Rezeptoren zu desensibilisieren und zu internalisieren (Keith et al., 1996; Whistler und von Zastrow, 1998; Eisinger et al., 2002). Aufgrund dieser Sonderstellung des Morphins läßt sich auf die Existenz weiterer alternativer Mechanismen bei der Toleranzentstehung schließen

(Whistler et al., 1999). Im Nachfolgenden sollen die an der Desensibilisierung und Internalisierung des μ -Opioidrezeptors beteiligten Regulations-mechanismen näher erläutert werden.

1.2.1.1 Rezeptorphosphorylierung

Die Bindung von hocheffizienten Agonisten bedingt eine Konformationsänderung am μ -Opioidrezeptor, wodurch verschiedene in der dritten intrazellulären Schleife sowie am Carboxylende gelegene Threonin- und Serinresten zum Substrat für G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) werden (Arden et al., 1995). Die daraus resultierende schnelle Phosphorylierung des Rezeptors erhöht wiederum seine Affinität für ein zytosolisches Protein aus der Familie der Arrestine (β -Arrestin 1), das daraufhin zur Zellmembran umverteilt wird und an den Rezeptor bindet (Law et al., 2000). Bei längerer Einwirkung des Agonisten resultiert dies in einer Abkopplung des Rezeptors von seinen assoziierten G-Proteinen, ein Vorgang der als Sequestrierung bezeichnet wird und zur Desensibilisierung der Rezeptoren beiträgt (Pak et al., 1997).

1.2.1.2 Rezeptorendozytose

Der β -Arrestin 1 gebundene Rezeptor geht nachfolgend unter Einbeziehung des Adapterproteins AP-2 einen Komplex mit dem Strukturprotein Clathrin ein (von Zastrow et al., 2003). Dynamin, ein weiteres Adapterprotein, vermittelt nun die Bindung des Rezeptor/ β -Arrestin 1 Komplexes an endozytische Vesikel, den so genannten „clathrin-coated pits“, mit deren Hilfe die Opioidrezeptoren von der Zelloberfläche in das Zytoplasma transportiert werden (Goodman et al., 1996). Damit sind die Rezeptoren nicht mehr für Liganden zugänglich, wodurch eine weitere Stufe der Anpassung an die permanente Rezeptoraktivierung erreicht wird (Law et al., 2000).

1.2.1.3 Rezeptorrecycling und -degradation

Die internalisierten Rezeptoren können durch die in den frühen Endosomen enthaltene saure Phosphatase wieder dephosphoryliert und nachfolgend an die Zelloberfläche verbracht werden (Pitcher et al., 1995). Dieser Vorgang wird als Recycling bezeichnet und geht mit einer Resensibilisierung der Rezeptoren einher (Koch et al., 1998). Dauert die

Agonistexposition jedoch länger an, so verschmelzen die frühen Endosomen mit Lysosomen zu so genannten Phagolysosomen, in denen die Rezeptoren degradiert werden. Diese Vorgänge, ergänzt durch die Exozytose neu synthetisierter und intrazellulär gespeicherter Rezeptoren, ermöglicht eine kontinuierliche Anpassung der Anzahl funktioneller Rezeptoren an die jeweiligen äußeren Bedingungen. Während δ -Opioidrezeptoren bereits nach kurzzeitiger Aktivierung größtenteils degradiert werden, bedingt die Stimulation von μ -Opioidrezeptoren eine Aktivierung der Mechanismen, die ihr Recycling beschleunigen (Ferguson et al., 1998). Als mögliche Ursache hierfür wird eine unvollständige Interaktion des μ -Opioidrezeptors mit dem „G protein-coupled receptor-associated sorting protein“ (GASP) diskutiert, welches als Adaptorprotein für den Kontakt des endozytierten Vesikels zu Lysosomen verantwortlich ist (Whistler et al., 2002). Die verschiedenen Schritte der Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung werden in Abbildung 4 dargestellt:

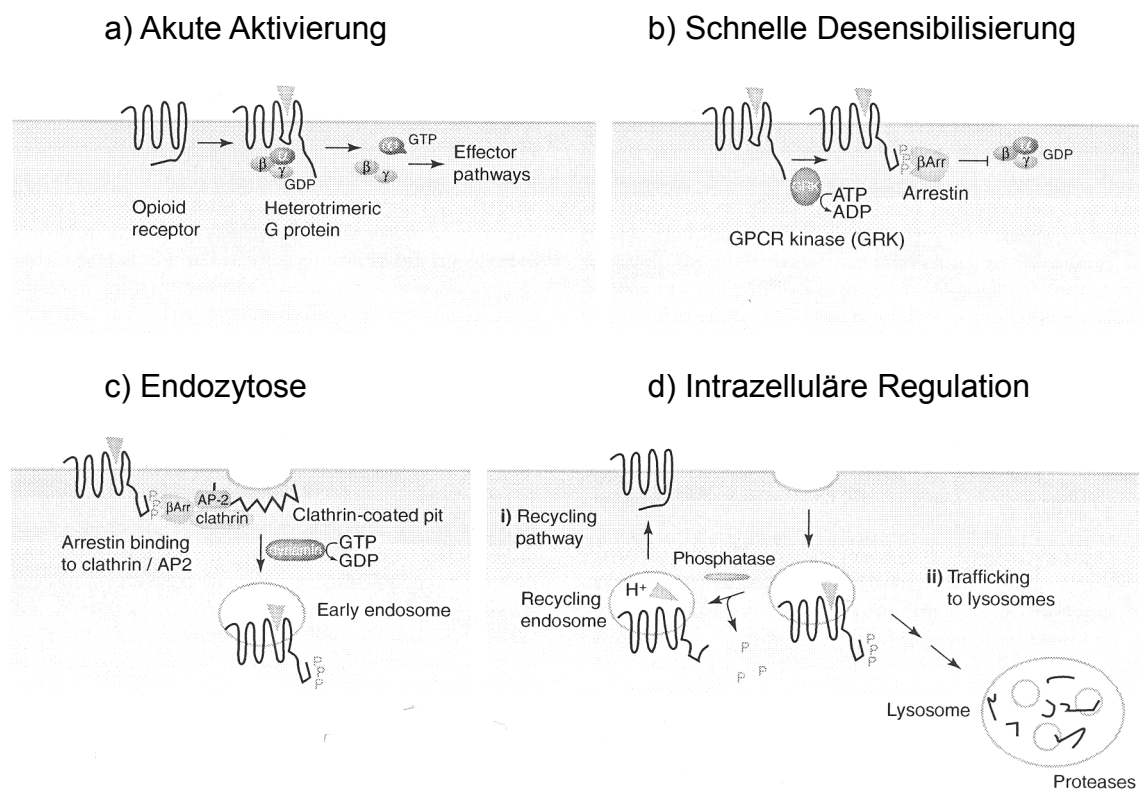


Abb. 4: a) Transmembrane Signalvermittlung nach akuter Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. b) Schnelle Desensibilisierung des phosphorylierten Rezeptors nach Anlagerung von Arrestinen. c) Endozytose des Rezeptors über „clathrin-coated pits“. d) Recycling und Degradation endozytierter Rezeptoren (von Zastrow et al., 2003).

1.2.2 Abhängigkeit

Als Abhängigkeit wird ein Phänomen bezeichnet, bei dem die Anwesenheit eines längerfristig verabreichten Pharmakons zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase zwingend erforderlich wird. Sie basiert auf kompensatorischen, der akuten Pharmakonwirkung entgegengesetzten Mechanismen. Diese Gegenregulation trägt nicht nur zum Phänomen der Toleranz bei, sondern ist für die Ausbildung von Entzugssymptomen maßgeblich verantwortlich (Taylor und Fleming, 2001). Die Induktion von Abhängigkeit ist nach chronischer Morphingabe besonders deutlich, da es die Rezeptoren nicht zu desensibilisieren vermag und somit eine dauerhafte inhibitorische Signaltransduktion bewirkt (Whistler et al., 1999).

Auf zellulärer Ebene geht Abhängigkeit mit vielfältigen Adaptationen opioidderger Signalkaskaden einher. So ist die akute Ansprechbarkeit chronisch aktivierter Rezeptoren stark herabgesetzt, obwohl ihre Anwesenheit für die Aufrechterhaltung von Abhängigkeit und der Auslösung von Entzugerscheinungen unabdingbar ist. Chronische Morphinexposition kann zu komplexen Veränderungen am Rezeptor selbst, aber auch an einer Vielzahl intrazellulärer Signalmoleküle führen, die an der Regulation der Funktion und Sensitivität von Rezeptoren beteiligt sind. Neben einem erhöhten Phosphorylierungsstatus bestimmter G β -Untereinheiten konnte dies im Stadium der Abhängigkeit u.a. auch bei der GRK2 beobachtet werden (Chakrabarti et al., 1999; Gintzler und Chakrabarti, 2006). Als Konsequenz hieraus kann eine chronische Morphinbehandlung zu einer veränderten Phosphorylierung und Internalisierung von Rezeptoren durch hocheffiziente Agonisten führen und somit die Adaptationsfähigkeit einer abhängigen Zelle auf äußere Einflüsse erheblich beeinträchtigen (Eisinger et al., 2002).

1.2.3 Sensibilisierung der Adenylylzyklase

Auf zellulärer Ebene führt die chronische Morphinbehandlung zur Sensibilisierung der Adenylatzyklaseaktivität, die sich im Entzug durch eine überschießende cAMP Produktion äußert. Dieses auch als „Adenylatzyklase-Supersensitivität“ bezeichnete Phänomen wurde ursprünglich in δ -Opioidrezeptor tragenden Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) Hybridzellen beobachtet (Sharma et al., 1975). Die Supersensitivität der Adenylatzyklase tritt nach chronischer Aktivierung einer Vielzahl inhibitorischer Rezeptoren wie α_2 -Adrenorezeptoren, CB1-Cannabinoidrezeptoren oder muskarinerge Acetylcholinrezeptoren auf und stellt nach wie vor das einzige zelluläre Korrelat für Abhängigkeit dar (Thomas und

Hoffmann, 1996; Nevo et al., 1998; Rhee et al., 2000). Als Auslöser für die Sensibilisierung der Adenylatzyklase wird heute eine kontinuierliche Hemmung bestimmter Isoformen der Adenylatzyklase (AC I, V und VI) durch inhibitorische $G\alpha$ -Untereinheiten vermutet. Hinweise dafür lieferten Experimente, bei denen der inhibitorische Signalweg durch Pertussistoxin unterbrochen oder die Reassoziaton aktivierter heterotrimerer G-Proteine durch Komplexierung freier $G\beta\gamma$ -Untereinheiten mit Hilfe von „scavenger“ Proteinen blockiert wurde (Avidor-Reiss et al., 1996, 1997; Ammer und Christ, 2002; Sunahara und Taussig, 2002). Im Gegensatz dazu ist der für die überschießende cAMP Produktion im Opioidentzug verantwortliche Regulationsmechanismus noch ungeklärt. Diskutiert werden unter anderem eine Beteiligung von $G\alpha_s$ und $G\beta\gamma$ -Dimeren (Ammer und Schulz, 1998), eine erhöhte Expression $G\beta\gamma$ -stimulierter Isoformen (AC II) bzw. Änderungen im Expressionsmuster der einzelnen Adenylatzyklasen (Chakrabarti et al., 1999), eine Phosphorylierung bestimmter Adenylatzyklaseisoformen (Watts und Neve, 2005; Tan et al., 2001) sowie eine Aktivierung und stärkere funktionelle Kopplung stimulatorischer Rezeptorsysteme (Ammer und Schulz, 1993, 1995, 1996). Die Bedeutung der chronisch Opioid induzierten Sensibilisierung der Adenylatzyklase wird derzeit in der Beeinflussung cAMP-regulierter Transkriptionsfaktoren (cAMP response element binding protein; CREB) gesehen, die in die Genregulation eingreifen und damit zur Ausbildung von Langzeiteffekten im Verlauf einer Abhängigkeit beitragen (Lane-Ladd et al., 1997; Nestler und Aghajanian, 1997).

1.3 cAMP-unabhängige Funktionen der Adenylatzyklase

Bei den Untersuchungen zur Regulation der katalytischen Aktivität der Adenylatzyklase konnten detaillierte Einsichten in die funktionellen Domänen gewonnen werden, die mit inhibitorischen bzw. stimulatorischen $G\alpha$ -Untereinheiten sowie $G\beta\gamma$ -Dimeren interagieren (Tesmer et al., 1997; Sunahara et al., 1997; Dessauer et al., 1998). Neben der Aufklärung der an der katalytischen Umwandlung von ATP zu cAMP beteiligten Aminosäuren (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997) konnten darüber hinaus noch Angriffspunkte für z.B. die PKC-vermittelte Phosphorylierung an der Adenylatzyklase VI identifiziert werden (Lin et al., 2002). Durch den Kanal- bzw. Transporter-ähnlichen Aufbau wurde schon frühzeitig vermutet, dass Adenylatzyklasen neben ihrer katalytischen Aktivität noch über weitere funktionelle Eigenschaften verfügen (Krupinski et al., 1989; Sunahara und Taussig, 2002).

In der Tat konnten Scholich et al. (1999) und Wittpoth et al. (2000) nachweisen, dass die C2-Domäne der Isoform AC V auf das stimulatorische G-Protein eine RGS Funktion ausübt. Diese bewirkt eine Beschleunigung des GTP/GDP-Austausches im Aktivierungszyklus der G-Proteine im Sinne einer GEF (GTP/GDP exchange factor) Funktion. Nachfolgend konnte ein vergleichbarer positiver „feedback“ auf inhibitorische $G\alpha$ -Untereinheiten durch die C1-Domäne der Adenylatzyklase V in demonstriert werden (Wittpoth et al., 2000). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die verschiedenen Isoformen der Adenylatzyklase nicht nur die Information einer Vielzahl von Rezeptor- und Effektorsystemen integrieren und weiterleiten können (Lustig et al., 1993), sondern auch zur Rückkopplung auf vorgeschaltete Rezeptorsysteme befähigt sind.

1.4. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, cAMP unabhängige Wirkungen der Adenylatzyklase auf die Regulation von Opioidrezeptoren und die Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit nach akuter und chronischer Morphinbehandlung zu identifizieren. Hierfür wurden in einem ersten Schritt Fusionsproteine bestehend aus der transmembranen Domäne von CD8 als Membrananker und den C1- bzw. C2-Domänen der Adenylat-zyklasen II und V hergestellt. Nachfolgend wurde die funktionelle Integrität der Konstrukte sowie der Nachweis ihrer „scavenger“ Funktion für $G\alpha_i$ -, $G\alpha_s$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten durch Expression in NG108-15 Hybridzellen bestimmt. Für die Untersuchung möglicher cAMP unabhängiger „feedback“ Mechanismen auf die Regulation von Opioidrezeptoren musste ein Zellsystem geschaffen werden, das keine endogenen, durch Opioide regulierbare Adenylatzyklaseisoformen enthält. Hierfür wurde der μ -Opioidrezeptor der Ratte stabil in COS-7 Zellen exprimiert. Durch transiente Transfektion dieser Zellen mit ein oder mehreren Konstrukten konnte der Einfluss der verschiedenen regulatorischen Adenylatzyklasedomänen auf die Rezeptor/G-Protein- Interaktion, cAMP Produktion und ERK1/2 Stimulation sowie auf die Agonist vermittelte Rezeptorinternalisierung, GRK2 und β -Arrestin1 Umverteilung untersucht werden. Durch chronische Morphinbehandlung der Zellen konnten zudem wertvolle Hinweise für die Bedeutung der einzelnen Adenylatzyklasedomänen für die Ausbildung zellulärer Korrelate für Toleranz und Abhängigkeit gewonnen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Alle Chemikalien stammten, soweit nicht gesondert angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Die Herkunft der verwendeten cDNAs und Antikörper wird in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

2.2 Zellmodelle

Die Ausbildung möglicher „feedback“ Mechanismen regulatorischer Adenylatzyklase-domänen auf die μ -Opioidrezeptorfunktion wurde an COS-7 Zellen untersucht. Bei diesen handelt es sich um eine mit dem „Simian Vacuolating Virus 40“ (SV 40) transformierte permanente Nierenzellkultur der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die durch Expression des Tumorantigens (T-Antigen), einem DNA-Replikationsregulator des SV 40, zur episomalen Replikation von Plasmiden mit einem entsprechenden Promotor (SV40 origin) befähigt sind (Gluzman, 1981). COS-7 Zellen stellen daher ein klassisches Modell zur transienten Überexpression von Proteinen in Säugerzellen dar (Watson et al., 1993). Für die Durchführung der vorliegenden Studie eignen sich COS-7 Zellen aus mehreren Gründen: 1) Sie besitzen lediglich eine einzige endogene Isoform der Adenylatzyklase (AC IX), die zudem nicht durch inhibitorische Rezeptoren und G-Proteine regulierbar ist (Premont, 1994). 2) Sie enthalten die für die funktionelle Kopplung von Opioidrezeptoren benötigten G-Proteine $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_z$ (Ammer und Christ, 2002). 3) Sie besitzen limitierende Mengen an GRK2 und β -Arrestin 1, so dass mögliche Einflüsse auf die Rezeptorinternalisierung erkannt werden können (Menard et al., 1997). 4) Schließlich sind sie zur Ausbildung zellulärer Korrelate für Toleranz und Abhängigkeit in Anwesenheit exogener Adenylatzyklasen (AC I, V und VI) befähigt (Avidor-Reiss et al., 1997). Da COS-7 Zellen keine endogenen Opioidrezeptoren enthalten, wurde der für die Analgesie bzw. Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit verantwortliche μ -Opioidrezeptor (Gainetdinov et al., 2004) stabil exprimiert.

Zur Charakterisierung einer möglichen „scavenger“ Funktion der Adenylatzyklase-konstrukte wurden diese transient in NG108-15 Hybridzellen exprimiert. NG108-15 Zellen stellen Hybridome aus Neuroblastomzellen der Maus und Gliomzellen der Ratte dar. Sie besitzen endogene δ -Opioidrezeptoren (Law et al., 1983), die über die inhibitorischen G-

Proteine $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, $G\alpha_{o1}$ und $G\alpha_{o2}$ die cAMP Produktion hemmen (Milligan et al., 1986). Die in NG108-15 Zellen endogen vorhandenen Adenylatzyklen sind nur unvollständig bekannt; sie enthalten jedoch die an der Ausbildung akuter und chronischer Opioideffekte beteiligte AC V, während AC I und II nicht exprimiert werden (MacEwan et al., 1996). Aufgrund dieser Ausstattung sind NG108-15 Zellen für funktionelle Untersuchungen der δ -Opioidrezeptor vermittelten Regulation der Adenylatzyklase besonders geeignet.

2.2.1 Zellkultur

Alle in der Zellkultur verwendeten Plastikgefäße wurden von der Firma TPP® bezogen. Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit Ventilationsdeckel und einer Bodenfläche von 25 cm², 75 cm² bzw. 150 cm² sowie Rundschaalen mit 60 cm² Grundfläche kultiviert. Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP Akkumulation und ERK1/2-Aktivierung wurden die Zellen in Zellkulturschaalen mit 12 bzw. 24 Vertiefungen angezüchtet.

2.2.1.1 Kultivierung von COS-7 Zellen

Wachstumsmedium:

500ml	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; Fa. PAA)
10 % (v/v)	Fötales Kälberserum (FKS; Fa. PAA), hitzeinaktiviert (56°C; 30 min)
4 mM	L-Glutamin (Fa. PAA)
100 IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. PAA)

Einfriermedium:

20 % (v/v)	FKS
10 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
in Wachstumsmedium gelöst	

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

8 g/L	NaCl
0,2 g/L	KCl
2,145 g/L	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O

in H₂O doppelt destilliert (dd), pH 7,43

PBS mit EDTA:

0,04% (m/v) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS, pH 7,43

Trypsin-Lösung in PBS mit EDTA:

0,05 % (m/v) Trypsin

0,02 % (m/v) EDTA in PBS, pH 7,43

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow (Modell 6.12 S; Fa. BDK). COS-7 Zellen wurden als Monolayer im Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal die Woche im Verhältnis 1/5 bis 1/10 verdünnt. Hierzu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit warmer PBS/EDTA-Lösung gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Durch Zugabe von Wachstumsmedium wurden die Zellen von ihrer Unterlage abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 300 x g (Minifuge; Fa. Heraeus) pelletiert. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium aufgenommen und je nach Versuch auf Zellkulturflaschen oder Petrischalen ausgesät.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Da die Transfektionseffizienz von COS-7 Zellen mit fortschreitender Passagierung nachlässt, wurde ein größerer Vorrat von Zellen aus einer frühen Passage in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurden die geernteten Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, in ein Einfrieröhrchen überführt und über Nacht bei -70°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in 10ml eiskaltem Wachstumsmedium resuspendiert und das DMSO durch Zentrifugation (300 x g; 10 min) entfernt. Das Zellpellet wurde in 37°C warmen Wachstumsmedium aufgenommen und die Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2 Transfektion von COS-7 Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in Säugerzellen mittels geeigneter

Vektoren bezeichnet.

2.2.2.1 Verwendete Plasmide

Alle verwendeten cDNAs lagen im Expressionsvektor pcDNA3.1(+) der Fa. Invitrogen vor. Die verwendeten Konstrukte wurden wie folgt bezeichnet und von den genannten Personen freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- μ -Opioidrezeptor der Ratte (Chen et al., 1993)
(μ ORpcDNA; Dr. Yu; Indianapolis, USA)
- Adenylatzyklase V des Kaninchens (Wallach et al., 1994)
(ACVpcDNA; Dr. Pfeuffer †; Düsseldorf)
- Adenylatzyklase II der Ratte (Feinstein et al., 1991):
(ACIIpcDNA; Dr. Wong; Hongkong, China)

Darüber hinaus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Plasmide hergestellt und verwendet:

- FLAG-CD8-Fragment (CD8pcDNA)
- FLAG-CD8-C1-Fragment der Adenylatzyklase II (IIC1pcDNA)
- FLAG-CD8-C2-Fragment der Adenylatzyklase II (IIC2pcDNA)
- FLAG-CD8-C1-Fragment der Adenylatzyklase V (VC1pcDNA)
- FLAG-CD8-C2-Fragment der Adenylatzyklase V (VC2pcDNA)

2.2.2.2 Bestimmung der Hygromycinsensitivität von COS-7 Zellen

Für die Erstellung einer stabilen Zelllinie war es nötig, die zur Selektion geeignete Konzentration von Hygromycin (Fa. Roth) zu bestimmen. Dazu wurden COS-7 Zellen auf eine 24-Well-Platte ausgesät und mit steigenden Konzentrationen an Hygromycin (6,25 - 800 μ g/ml) behandelt. Aus diesen Versuchen wurde für die anfängliche Selektion eine Hygromycinkonzentration von 400 μ g/ml und zur Erhaltung stabiler Zelllinien eine Konzentration von 200 μ g/ml abgeleitet.

2.2.2.3 Lipid-Komplex-Transfektion

Bei der Lipid-Komplex-Transfektion wird die Plasmid-DNA durch das Reagenz Roti-Fect® (Fa. Roth) in die Zellen eingeschleust. Die DNA wird dabei in Lipidvesikel eingeschlossen und durch Verschmelzung mit der Zellmembran in die Zellen eingebracht. Für jeden Ansatz wurden 5 oder 10 µg Plasmid-DNA in 600 µl DMEM zusammen mit 25 µl Roti-Fect® für 30 min inkubiert. Das für COS-7 Zellen geeignete DNA/Reagenzverhältnis wurde zuvor in Pilotstudien experimentell bestimmt. Die Zellen einer Petrischale wurden mit PBS gewaschen und mit 9 ml warmen Wachstumsmedium ohne Antibiotikazusatz bedeckt. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden zugegeben, die Zellen für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 10 ml normalem Wachstumsmedium aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche umgesetzt.

2.2.2.4 Calcium-Phosphat-Copräzipitation

Calciumchlorid-Lösung:

0,368 g/ml $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in H_2O dd, steril filtriert

Transfektionspuffer:

16,4 mg/ml NaCl

400 µg/ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

10 mg/ml N'-N-bis-Aminoethansulfonsäure (BES) in H_2O dd, pH 6,95, steril filtriert

Bei der Calcium-Phosphat-Copräzipitation wird die im Transfektionsansatz enthaltene DNA zusammen mit unlöslichem Calciumphosphat gefällt und schlägt sich als feines Copräzipitat auf den Zellen nieder. Für jeden Ansatz wurden 10 µg Plasmid-DNA in 450 µl H_2O dd und 50 µl CaCl_2 -Lösung gemischt und zusammen mit 500 µl Transfektionspuffer für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das geeignete DNA/Reagenz-Verhältnis wurde in Vorversuchen bestimmt. Die in Petrischalen ausgesäten Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 10 ml Wachstumsmedium bedeckt und der Transfektionsansatz gleichmäßig darauf verteilt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgelöst und für die jeweiligen Experimente ausplattiert.

2.2.3 Herstellung stabiler COSµ-Klone

Um eine mögliche Regulation der Rezeptorfunktion durch die jeweiligen Adenylatzyklase-domänen detektieren zu können, musste eine Zelllinie mit konstant hoher Rezeptordichte generiert werden. Da COS-7 Zellen durch die Expression des T-Antigens zur episomalen Replikation von Plasmiden befähigt sind, musste die μ -Opioidrezeptor cDNA in ein Plasmid subkloniert werden, das keinen SV40 origin enthält. Hierfür wurde auf das Plasmid pCEP4 (Fa. Invitrogen) zurückgegriffen (Plasmid pCEP- μ OR). Die Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat-Copräzipitation transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion das Selektionsantibiotikum Hygromycin (Fa. Roth) in einer Konzentration von 400 μ g/ml dem Wachstumsmedium zugegeben. Nach ca. 10 Tagen konnten mit einer 10 μ l-Pipette unter dem Mikroskop einzelne Kolonien isoliert werden, die das Plasmid stabil in ihr Genom eingebaut hatten. Nach ihrer Expansion wurden die Zellpopulationen mittels Radioligandenbindung auf ihre Rezeptorexpression hin untersucht. Diejenige Kolonie mit der höchsten Rezeptorbindung (Linie C3) wurde einer wiederholten Selektion in Anwesenheit von 400 μ g Hygromycin/ml Medium unterworfen. Insgesamt wurden 6 Klone isoliert, die Rezeptorgehalte von 843 bis 1216 fmol pro mg Membranprotein aufwiesen. Der Klon mit der höchsten Rezeptorexpression (b3) wurde für die Durchführung sämtlicher Versuche ausgewählt. Von diesem wurde sofort nach der Subklonierung ein größerer Vorrat an Zellen in flüssigem Stickstoff konserviert. Für die Versuche wurden die Zellen in einer Erhaltungsdosis von 200 μ g/ml Hygromycin kultiviert und zwei- bis dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Rezeptorenexpression wurde in regelmäßigen Abständen mittels Radioligandenbindung kontrolliert.

2.2.4 Opioidbehandlung

Für die Ausbildung chronischer Opioidwirkungen wurden die Zellen für 24 Stunden mit Morphin behandelt (Avidor-Reiss et al., 1997; Ammer und Christ, 2002). Für alle anderen Versuche wurden die Liganden für die in den einzelnen Abschnitten beschriebenen Zeiträume zum Wachstumsmedium zugegeben.

Verwendete Substanzen:

Morphin-HCl (Fa. Merck)

[D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin (DADLE; Fa. Bachem)

Naloxon-HCl (Fa. Merck)

Etorphin-HCl (National Institute of Drug Abuse; Bethesda, USA)

Forskolin (Fa. Calbiochem)

Die jeweiligen Substanzen waren in 100- bis 1000fach konzentrierten Stammlösungen angesetzt und steril filtriert. Sie wurden dem vorgewärmten Wachstumsmedium zugegeben, mit dem die Zellen ausgesät wurden. Für die akuten Behandlungen wurden die Zellen 24 Stunden zuvor ausgesät, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend das 37°C warme Medium mit den Liganden zugegeben.

2.3 Herstellung der Adenylatzyklasekonstrukte

2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):

40 mmol/l Trihydroxymethylaminomethan (Tris-HCl)

2 mmol/l Na₂EDTA x 2H₂O

in H₂O dd, auf pH 8,5 eingestellt

1 % (m/v) Agarosegel:

500 mg Agarose (Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH)

0,2 µg Ethidiumbromid

in 50 ml TAE-Puffer gelöst

DNA kann durch Anlegen einer elektrischen Spannung im Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA kann diese im UV-Licht detektiert werden. Die Größe der DNA-Fragmente wird durch Vergleich mit einem parallel mitlaufenden Längenstandard abgeschätzt.

Für die Herstellung des Gels wird die Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid in eine Gelelektrophoresekammer (Modell B1, Owl Separation Systems) gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Kammer mit TAE-Puffer als Laufmittel aufgefüllt. Zu der in H₂O gelösten DNA wurde Auftragspuffer (6 x Loading Dye Solution, Fa. Fermentas) gegeben und je eine Probe in die Taschen des Gels pipettiert. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde in eine weitere Tasche 0,5 µg eines Längenstandards pipettiert. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der Marker „Lambda DNA/Eco911“ der Fa. Fermentas verwendet. Die

Auftrennung der Proben erfolgte für eine Stunde bei einer Stromstärke von 70 V. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht im Video-Imager (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab) ausgewertet.

2.3.2 Primerdesign

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden 15-30 Nukleotide lange DNA-Fragmente, die jeweils komplementär zu den zu amplifizierenden DNA-Segmenten sind, als Starthilfe (Primer) benötigt. Die entsprechenden Zielsequenzen für die jeweiligen Isoformen der Adenylatzyklase und von CD8 wurden der NCBI Entrez Nucleotide Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) entnommen. Den abgeleiteten Primern wurden ggf. zusätzliche Randsequenzen, Markersequenzen, Start- und Stoppcodons bzw. künstliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme hinzugefügt. Die Randsequenzen schaffen „Pufferzonen“ am 5′- und 3′-Ende des PCR-Produkts, die das Fragment vor Abbau schützen. Zudem benötigen manche Restriktionsenzyme beidseits ihrer Erkennungssequenz noch einen Überhang von ein bis drei Basenpaaren, der ebenfalls durch die Randsequenz geschaffen wird. Als Marker („tag“) werden bestimmte Nukleotidsequenzen verwendet, mit denen die translatierten Proteine, z.B. über Antikörperbindung, nachgewiesen werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende DNA-Fragmente mittels PCR vervielfältigt: Die transmembrane Domäne des humanen T-Zell-Rezeptors CD8 (Nukleotide 69-645 nach GI:179145; im Folgenden als CD8 bezeichnet), die erste bzw. zweite zytoplasmatische Domäne der Adenylatzyklase II der Ratte (Nukleotide 700-

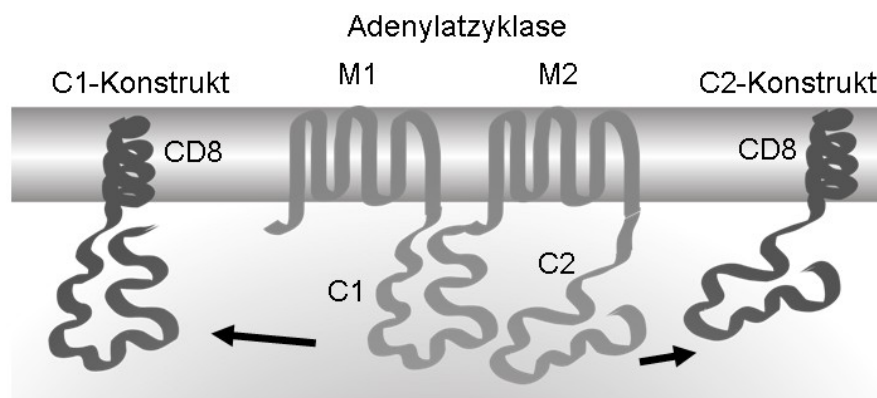


Abb. 5: Halbschematische Darstellung der aus den C1- und C2-Domänen einer

Adenylatzyklase und der transmembranen Domäne von CD8 zusammengesetzten Konstrukte.

1863 bzw. 2529-3339 nach GI:13591905; bezeichnet als IIC1 bzw. IIC2) sowie die erste bzw. zweite zytoplasmatische Domäne der AC V vom Kaninchen (Nukleotide 1789-2883 bzw. 3622-4377 nach GI:729241; bezeichnet als VC1 bzw. VC2). Darüber hinaus wurde die gesamte cDNA der Isoform AC II zur Subklonierung in den Vektor pcDNA3.1 vervielfältigt. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Konstrukte wird in Abbildung 5 gegeben.

Für die Konstruktion der Primer wurden folgende Nukleotidsequenzen verwendet (in 5'→3'-Orientierung):

- Randsequenz („clamp“): GCG für „vorwärts“ bzw. CGC für „rückwärts“ Primer
- Startcodon: ATG
- Stoppcodon: TAG
- Schnittstelle des Enzyms HindIII: AAGCTT
- Schnittstelle des Enzyms XbaI: TCTAGA
- Schnittstelle des Enzyms XhoI: CTCGAG
- FLAG-Tag: GAC TAC AAA GAC GAC GAC GAC AAA

Zusätzlich wurden folgende Konsensussequenzen der entsprechenden Zielstrukturen verwendet (jeweils „vorwärts“ und „rückwärts“ Sequenzen in 5'→3'-Orientierung). Die Zahl in der ersten Klammer gibt die Bezeichnung des Primers an, die zweite Klammer enthält die Lage in der Zielsequenz:

CD8:	GCC TTA CCA GTG ACC GCC TTG (16) (69-89; GI:179145) CAG TGA CAG GAG AAG GAC CCC (11) (625-645)
ACII:	AAG CTA CTC CGT GTG TTT TCG (19) (376-396; GI:13591905) GGA TGC CAA GTT GCT CTG AGA (4) (3319-3339)
ACIIC1:	GAG CTT GCC TTG CAG CAA ACC TAT (15) (700-723) GAA TGC TGG CAG CGT AGT AGC (2) (1843-1863)
ACIIC2:	AGA CAG AGT GAA TAT TAC TGC (12) (2529-2549) GGA TGC CAA GTT GCT CTG AGA (4) (3319-3339)
ACVC1:	CCG GCC GAG GTC TCC CAG AGG CAG (9) (1789-1812; GI:456756) CTA GCG GTC GTC CAC CTG CTT GGA (10) (2860-2883)

ACVC2: TCC ACC GCC CGC CTG GAC TTC CTC (13) (3622-3645)
 ACT GAG CGG GGG CCC GCC GTT (14) (4357-4377)

Die vollständigen Primer wurden aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt:

CD8 vorwärts: clamp-HindIII-Start-FLAG-Tag-Konsensussequenz
CD8 rückwärts: Konsensussequenz-XhoI- clamp
AC Fragmente vorwärts: clamp-XhoI-Konsensussequenz
AC Fragmente rückwärts: Konsensussequenz-Stopp-XbaI-clamp
ACII vorwärts: clamp-HindIII-Konsensussequenz
ACII rückwärts: Konsensussequenz-XbaI-clamp

Alle Primer wurden durch die Firma MWG synthetisiert. Durch die Anordnung der Schnittstellen war es möglich, die erstellten PCR-Produkte in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) zu klonieren, so dass Fusionsproteine aus dem CD8-Membrananker und den verschiedenen Adenylatzyklasedomänen entstanden. Da die transmembrane Domäne des T-Zell-Rezeptors nur aus einer kurzen hydrophoben Kette besteht (Janeway et al., 2002), ist eine Dimerisierung der Konstrukte mit der in COS-7 Zellen endogen exprimierten AC IX ausgeschlossen. Abbildung 6 zeigt schematisch die Zusammensetzung der Konstrukte, wie sie in die „multiple cloning site“ des Vektors pcDNA3.1(+) eingebracht werden konnten.

HindIII	FLAG-Tag	CD8-Fragment	XhoI	Adenylatzyklase-Fragment	XbaI
---------	----------	--------------	------	--------------------------	------

Abb. 6: Bestandteile der Konstrukte aus Konsensussequenzen für Restriktionsenzyme (HindIII, XhoI, XbaI), der Markierungssequenz FLAG-Tag und den Fragmenten des CD8-T-Zellrezeptors sowie der jeweiligen Adenylatzyklasedomänen.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Ein DNA-Doppelstrang wird durch Hitze denaturiert, die Primer binden an die einsträngige DNA und die zugegebene

DNA-Polymerase amplifiziert den innerhalb der Primerpaare liegenden Sequenzabschnitt. Da jedes neu erstellte Fragment als Template für einen weiteren Zyklus der Vervielfältigung dienen kann, ist im Idealfall ein exponentieller Anstieg der Produktmenge zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Reaktionen im Primus 25/96 Thermocycler (Fa. MWG-Biotech) durchgeführt. Als Standardprogramm wurde benutzt:

Deckelheizung:	95°C
Initiale Denaturierung:	95°C; 2 min
30 Zyklen bestehend aus:	
Denaturierung:	95°C, 1 min
Primeranlagerung:	50-60°C; 45 sec
Kettenverlängerung:	72°C; 1 min
Endverlängerung:	72°C; 10 min

Die exakte Anlagerungstemperatur bei den einzelnen Experimenten orientierte sich an den Schmelztemperaturen der verwendeten Primerpaare. Jeder PCR-Ansatz bestand auf insgesamt 50 µl und wurde in sterilen PCR-Gefäßen mit 0,2 ml Fassungsvermögen durchgeführt (Fa. Qiagen). Jeder Ansatz (50 µl Gesamtvolumen) enthielt 2 mmol/l MgCl₂, 5 µl 10 x PCR Buffer, je 0,2 mmol/l der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 Einheit Taq DNA Polymerase (alle genannten Reagenzien von Fa. Fermentas), 1,25 µl DMSO, 1 µmol/l Primer und 1 ng Matrizen-DNA.

2.3.4 Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen oder Gelen

Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit QIAquick Zentrifugationssäulchen (Fa. Qiagen). Die inaktivierten PCR-Ansätze oder die mit sterilen Skalpellklingen ausgeschnittenen Agarosegel-Stücke wurden im mitgelieferten Puffer gelöst. Wurden PCR-Produkte aus Gelfragmenten isoliert, so wurden diese durch Erhitzen auf 60°C für 15 min geschmolzen. Anschließend wurde der Ansatz auf die Säulchen gegeben und diese für 1 min bei 8.000 x g in der Tischzentrifuge Mikro Rapid K (Fa. Hettich) zentrifugiert. Die DNA wird dabei in der Membran des Säulchens zurückgehalten. Nach einem Waschschrift, der durch einminütige Zentrifugation mit Waschpuffer erfolgte, wurde die DNA durch Zugabe von 30 µl sterilem H₂O und erneuter Zentrifugation für 1 min bei 8.000 x g eluiert.

2.3.5 Restriktionsverdau

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Vektoren bzw. zur Kontrolle von PCR-Produkten ist es nötig, DNA gezielt zu schneiden. Dies erfolgt durch Restriktionsenzyme, die DNA an definierten Sequenzmotiven schneiden. Die Restriktionsansätze enthielten den auf das jeweilige Enzym abgestimmten Puffer, 1-2 µg DNA und je 5 Einheiten der entsprechenden Enzyme (Fa. Fermentas) und wurden mit sterilem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend für 20 min auf 65°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese nach Zugabe von 4 µl 6 x Probenpuffer. Sollten die Fragmente subkloniert werden, wurden sowohl die PCR-Fragmente als auch die entsprechenden Vektoren mit identischen Enzymen geschnitten. Durch Verwendung unterschiedlicher Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende der Fragmente konnten diese in korrekter Orientierung in die „multiple cloning site“ des Vektors eingebracht werden.

2.3.6 Ligation

Für jeden Ligationsansatz wurden die geschnittenen Vektoren zusammen mit den isolierten Inserts, letzere im Überschuß, in Gegenwart von 20 Einheiten T4 DNA Ligase (Fa. Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 60 µl Ligationspuffer für 9 Stunden bei 22°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Enzym bei 65°C für 10 min inaktiviert und der Ligationsansatz für die Transformation von Bakterien verwendet.

2.3.7 Herstellung kompetenter Bakterien

TfB I (Transformationspuffer I):

30 mmol/l	Kaliumacetat
50 mmol/l	MnCl ₂
100 mmol/l	RbCl ₂
10 mmol/l	CaCl ₂
15 %	Glycerin
gelöst in H ₂ O dd, eingestellt auf pH 5,8	

TfB II (Transformationspuffer II):

10 mmol/l	MOPS
75 mmol/l	CaCl ₂

10 mmol/l RbCl_2

15 % Glycerin

gelöst in H_2O dd, eingestellt auf pH 6,5

Um Plasmide in Bakterien einbringen zu können, müssen diese durch chemische Vorbehandlung kompetent gemacht werden. *E.coli* vom Stamm Top10F (Fa. Invitrogen) wurden hierfür in LB-Medium in eine exponentielle Wachstumsphase gebracht, im Eiswasserbad abgekühlt und in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Die Bakterien wurden anschließend in ebenfalls 4°C kaltem Tfb I-Puffer resuspendiert und für 10 min im Eiswasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, in kaltem Tfb II-Puffer aufgenommen und in 200 µl-Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

2.3.8 Transformation von Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden im Eiswasserbad aufgetaut und ca. 50 - 500 ng der Plasmide zugegeben. Der Ansatz wurde für 20 min im Eiswasserbad inkubiert und die Bakterien anschließend durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 sec transformiert. Die Bakterien wurden dann für 2 min bei 4°C abgekühlt, in 450 ml vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Von diesem Transfektionsansatz wurden jeweils 20 bzw. 200 µl auf je eine vorgewärmte LB-Agarplatte, die 100 mg/l Ampicillin als Selektionsantibiotikum enthielt, mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Die Platten wurden zuerst für 30 min bei Raumtemperatur (RT) und anschließend bei 37°C und über Nacht inkubiert.

2.3.9 Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

In Bakterien vermehrte Plasmide können mit Hilfe der alkalischen Extraktionsmethode isoliert werden (Birnboim und Doly, 1979). Dabei werden die Bakterien durch die Anwesenheit von SDS lysiert und die DNA denaturiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die chromosomale DNA zusammen mit denaturierten Proteinen gefällt. Die doppelsträngige Plasmid-DNA wird nach Abzentrifugation des Präzipitats isoliert, mit Isopropanol gefällt und in H_2O dd aufgenommen. Die Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA kann

anschließend photometrisch bei $\lambda = 260/280$ nm bestimmt werden. Für die Plasmidextraktion wurde der „Plasmid DNA Purification Kit“ der Fa. Macherey-Nagel, verwendet.

Nucleo-Bond Puffer:

Puffer S1: 50 mmol/l Tris-HCl
 10 mmol/l EDTA
 100 μ g/ml RNase A
 gelöst in H₂O dd; eingestellt auf pH 8,0

Puffer S2: 280 mmol/l NaOH
 1 % (m/m) Natrium-Dodecylsulfat (SDS)
 gelöst in H₂O dd

Puffer S3: 2,8 mol/l Kaliumacetat
 gelöst in H₂O dd; eingestellt auf H 5,1

Puffer N2: 100 mmol/l Tris/H₃PO₄
 15 % (v/v) Ethanol
 900 mmol/l KCl
 0,15 % (m/v) t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton-X 100)
 gelöst in H₂O dd; eingestellt auf pH 6,3

Puffer N3: 100 mmol/l Tris/H₃PO₄
 15 % (v/v) Ethanol
 1,15 mol/l KCl
 gelöst in H₂O dd; eingestellt auf pH 6,3

Puffer N5: 100 mmol/l Tris/H₃PO₄
 15 % (v/v) Ethanol
 1 mol/l KCl
 gelöst in H₂O dd; eingestellt auf pH 8,5

Von einer Agarplatte wurden einzelne Bakterienkolonien entnommen und in sterilen Röhrchen mit 3 ml LB-Medium und 100 mg/l Ampicillin über Nacht bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Von den Kulturen wurden 1,5 ml Bakteriensuspension entnommen

und die Plasmid-DNA wie unten beschrieben gewonnen. Die Integrität der Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau und Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Anschließend wurden 40 µl der verbliebenen Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes in 150ml LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin über Nacht vermehrt. Die Bakterien wurden im Eiswasserbad abgekühlt und bei 2.500 x g im GSA Festwinkel-Rotor in der Sorvall® RC-5-Zentrifuge (Fa. DuPont Instruments) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml Puffer S1 resuspendiert, mit 12 ml Puffer S2 für 2 min lysiert und die Reaktion durch Zugabe von 12 ml Puffer S3 gestoppt. Durch eine Zentrifugation bei 12.000 x g wurden die Bakterienreste sedimentiert. Der Überstand wurde nun auf eine AX 500-Säule gegeben, die zuvor mit 5 ml Puffer N2 äquilibriert worden war. Nach der Bindung der Plasmid-DNA wurde die Säule mit 32 ml Puffer N3 gewaschen und mit 15 ml Puffer N5 in Corex®-Tubes (Fa. DuPont Instruments) eluiert. Die DNA wurde mit 11 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 22.000 x g für 30 min bei 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in H₂O dd aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde im Spektrophotometer (U-3200; Fa. Hitachi) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Es wurde eine weitere Messung bei $\lambda = 280$ nm durchgeführt, um den Proteinanteil der Präparation abzuschätzen. Die Reinheit der DNA-Präparation wurde durch Bildung des Quotienten aus OD 280/OD 260 beurteilt.

2.3.10 Konservierung von Bakterien in Glycerol

Plasmidhaltige Bakterienstämme konnten zur Konservierung in Glycerol eingefroren werden. Hierzu wurden 850 µl einer frischen Übernachtskultur mit 150 µl sterilem Glycerol vermischt und durch Immersion in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend im -80°C - Gefrierschrank. Zum Anzüchten wurde ein kleiner Teil der gefrorenen Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in warmem LB-Medium resuspendiert.

2.4 Bestimmung von Opioidrezeptoren

Die pharmakologische Charakterisierung der in COS-7 Zellen exprimierten μ -Opioidrezeptoren erfolgte mittels Radioligandenbindung an isolierten Plasmamembranen (Vachon et al., 1987). Die Bindungsstudien erfolgten mithilfe des radioaktiv markierten Antagonisten ³H-Diprenorphin, der eine hohe Affinität sowohl zu G-Protein gekoppelten als

auch ungekoppelten Rezeptoren aufweist.

2.4.1 Membranpräparation

Homogenisierungspuffer (HB):

5 mmol/l	Tris-HCl
1 mmol/l	Ethylenglycol-bis(β -Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA)
1 mmol/l	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (DTT)
gelöst in H ₂ O dd, eingestellt auf pH 7,4	

Die aus einer 75 cm²-Kulturflasche geernteten Zellen wurden in 10 ml HB resuspendiert und für 10 sec homogenisiert (Polytron; Stufe 6; Fa. Bachofer). Intakte Zellen und Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 300 x g sedimentiert. Die Plasmamembranen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 29.500 x g bei 4°C für 30 min isoliert (Rotor SS 34; Fa. DuPont Instruments). Die pelletierten Membranen wurden erneut in 5 ml HB resuspendiert und unter gleichen Bedingungen für 20 min zentrifugiert. Die Membranen wurden anschließend in 5 mM Tris-HCl, pH 7,43, aufgenommen.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC-Lösung):

0,1 % (m/v)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0,2 % (m/v)	Na ⁺ /K ⁺ -Tartrat
10 % (m/v)	Na ₂ CO ₃
gelöst in H ₂ O dd	

Lowry A:

10 ml	CTC-Lösung
10 ml	0,8 M NaOH
20 ml	5 % (m/v) SDS-Lösung

Lowry B:

1 ml	Folin-Ciocalteaus Phenol Reagenz (Folin-Reagenz)
------	--

gelöst in 5 ml H₂O dd

Standardreihe:

Std A:	H ₂ O dd
Std B:	2,5 µg/100 µl bovines Serumalbumin (BSA)
Std C:	5 µg/100 µl BSA
Std D:	7,5 µg/100 µl BSA
Std E:	10 µg/100 µl BSA

Die Proteinmenge wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer durch Tyrosin und Tryptophan vermittelten Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺, das nachfolgend mit Folinreagenz einen tiefblauen Farbkomplex bildet.

Die Proteinbestimmung erfolgte jeweils im Doppelansatz. Die in jeweils 100 µl H₂O dd verdünnten Proben wurden mit 200 µl Lowry A für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jeweils 100 µl Lowry B zugesetzt, die Ansätze gemischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Standardlösungen wurde entsprechend verfahren. Die Farbintensität wurde anschließend im Spektrophotometer (U-3200; Fa. Hitachi) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm gemessen. Der Proteingehalt einer Probe wurde durch lineare Regression anhand der Standardkurve ermittelt.

2.4.3 Radioligandenbindung

Blocklösung für Glasfaserfilter:

0,1% (m/m) Polyethylenglycol (PEG)
gelöst in H₂O dd

Bindungspuffer:

50 mmol/l Tris-HCl
5 mmol/l MgCl₂
gelöst in H₂O dd, eingestellt auf pH 7,4

³H-Diprenorphin (Fa. PerkinElmer; spez. Akt. 54,9 Ci/mmol):

1 mCi/ml in Bindungspuffer

2.4.3.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d

Als Dissoziationskonstante (K_d) wird diejenige Konzentration eines Liganden bezeichnet, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Sie wird in Sättigungsexperimenten aus dem Verhältnis des gebundenen zum freien Anteil eines Radioliganden ermittelt. Bei konstanter Rezeptorzahl nähert sich der Anteil des gebundenen Radioliganden mit steigender Ligandenkonzentration in Form einer hyperbolen Funktion einem Plateau an, das der maximalen Bindungskapazität (B_{\max}) entspricht. Aus einem Sättigungsexperiment können die Werte für B_{\max} und K_d graphisch abgeleitet werden. Hierzu wurde das Computerprogramm GraphPad Prism (Fa. GraphPad Software Inc.) verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Bindung (B_0) von ^3H -Diprenorphin am μ -Opioidrezeptor erfolgte in Anwesenheit eines molaren Überschusses an Naloxon. Die spezifische Bindung wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$B_0 = B_{\text{total}} - B_{\text{unspez.}}$$

B_0 = spezifische Bindung von ^3H -Diprenorphin

B_{total} = Bindung von ^3H -Diprenorphin in Abwesenheit von Naloxon

$B_{\text{unspez.}}$ = Bindung von ^3H -Diprenorphin in Anwesenheit von Naloxon

Jede Bestimmung erfolgte im Doppelansatz und an frisch präparierten Membranen von COS μ -Zellen. Alle Arbeitsschritte wurden im Eisbad durchgeführt. Die Reaktionsansätze zur Erstellung der Sättigungskurve bestanden aus steigenden Konzentrationen an ^3H -Diprenorphin (0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 und 16 nmol/l). Jeder Ansatz enthielt 200 μg Membranprotein in einem Gesamtvolumen von 200 μl Bindungspuffer. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Naloxon bestimmt. Die Ansätze wurden gemischt und bis zum Erreichen des Equilibriums im Eiswasserbad inkubiert (4°C; 120 min) Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer wurde das an die Plasmamembranen gebundene ^3H -Diprenorphin durch Filtration über Silikatglasfaser-filter (GF/B;

Fa. Whatman®) mit Hilfe einer Vakuum Filtrationseinheit (Fa. Millipore) abfiltriert. Zur Absättigung der unspezifischen Bindung wurden die Glasfaserfilter zuvor in PEG-Blocklösung eingelegt. Die Filter wurden dreimal mit 3 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, in Zählfläschchen überführt (Minis® 2000; Fa. Zinsser Analytic) und mit je 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® EcoPlus; Fa. Roth) extrahiert. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät (Fa. Beckman; Modell LS6500) bestimmt und zur Erstellung der Sättigungskurven verwendet.

2.4.3.2 Bestimmung der Rezeptorendichte B_{\max}

Mithilfe des K_d -Wertes des Radioliganden lässt sich aus seiner spezifischen Bindung auf die maximale Bindungskapazität in der Membranpräparation schließen. Hierbei wird zunächst die eingesetzte Konzentration des Radioliganden (L) unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Radioliganden und der Messgenauigkeit des Szintillationszählers (Quench) bestimmt. Mit folgender Formel lässt sich nun auf die maximale Rezeptorendichte schließen:

$$B_{\max} = B_0 \times \frac{K_d + L}{L}$$

B_{\max} = maximale Bindungskapazität

B_0 = spezifische Bindung

L = Konzentration des Radioliganden

K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Anordnung, wobei die eingesetzte Radioligandenkonzentration etwa im Bereich der K_d lag. Je Ansatz wurden ca. 200 µg Membranprotein in 200 µl Gesamtvolumen eingesetzt und die unspezifische Bindung durch Zugabe von 10 µmol/l Naloxon bestimmt. Die Versuchsansätze wurden für 2 Stunden im Eiswasserbad bis zur Erreichen des Equilibriums inkubiert und anschließend durch Filtration über Whatman® GF/B Glasfaserfilter gestoppt.

Jedes Experiment wurde in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.4.4 Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Rezeptoren der COS μ -Zellen wurden diese auf Glas-Coverslips ausgesät. Nach zwei Tagen wurde die Hälfte der Zellen für eine Stunde mit 10 nmol/l Etorphin bei 37°C im Brutschrank behandelt. Dann wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7 % (m/v) Formalin für 15 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS plus 100 mmol/l Glycin wurden die Zellen mit PBS plus 0,1% (v/v) Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 5% (m/v) BSA in PBS geblockt. Als erster Antikörper wurde ein gegen den C-Terminus des μ -Opioid-rezeptors gerichteter polyklonaler Antikörper (Fa. Gramsch Laboratories) in einer Konzentration von 1/1000 verdünnt in Blocklösung verwendet. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurden die Zellen gewaschen und eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper (FITC-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG; Alexa Fluor® 488) inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter dem konfokalen Mikroskop (LSCM 510; Fa. Zeiss).

2.5 Bestimmung der Rezeptor-G-Protein-Interaktion

2.5.1 GTP γ S-Bindung

Waschpuffer:

50 mmol/l	Tris-HCl
5 mmol/l	MgCl ₂
gelöst in H ₂ O dd, eingestellt auf pH 7,4	

Puffer zur Membranpräparation:

Waschpuffer mit Zusatz von	
10 μ mol/l	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
10 mmol/l	Benzamidin

Bindungspuffer:

Membranpuffer mit Zusatz von
 200 mmol/l EGTA
 120 mmol/l NaCl
 50 µmol/l Guanosindiphosphat (GDP)

³⁵S-GTPγS (Fa. Amersham Biosciences; spezifische Aktivität 1000Ci/mmol):

1 mCi/ml Stammlösung in Bindungspuffer

Mittels GTPγS-Bindung kann die Zahl der vom Rezeptor aktivierten G-Proteine bestimmt werden. Sie stellt daher ein Maß für die Funktionalität des Rezeptors dar (Harrison und Traynor, 2003). Bei dem eingesetzten Guanosin-5'-0-(γ-[³⁵S]thio-)triphosphat handelt es sich um Guanosintriphosphat (GTP), dessen tertiäres Phosphat durch einen radioaktiv markierten Schwefel substituiert wurde. Im Versuch konkurriert es mit dem endogenen GTP und bindet an seiner Stelle an die aktivierte Gα-Untereinheit. Da das γ-Thiophosphat durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Gα-Untereinheit nicht hydrolysiert werden kann, akkumuliert dieses und kann anschließend durch Messung der eingebauten Radioaktivität bestimmt werden.

Zur Versuchsdurchführung wurden Zellen einer 75 cm²-Kulturflasche geerntet und Membranen hergestellt. Je Ansatz wurde 20 µg Membranprotein eingesetzt. Bei jeder Bestimmung wurden die Basalaktivität, die unspezifische Bindung und der vom Rezeptor stimulierte Einbau von ³⁵S-GTPγS jeweils im Dreifachansatz bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µmol/l GTPγS bestimmt, die Aktivierung des µ-Opioidrezeptors erfolgte durch Zugabe von 10 µmol/l DADLE. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurden die Membranen mit steigenden Konzentrationen an DADLE (1 – 10 µmol/l) behandelt. ³⁵S-GTPγS wurde in einer Konzentration von 100 pmol/l verwendet. Alle Ansätze wurden mit Bindungspuffer auf 200 µl aufgefüllt und für 30 min bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Das an die Membranen gebundene ³⁵S-GTPγS wurde durch Filtration über Whatman® GF/B-Filter wie oben beschrieben isoliert. Die Filter wurden in Zählröhrchen überführt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und gezählt.

2.6 Bestimmung der Effektorregulation

2.6.1 Adenylatzyklaseaktivität

Um Aussagen über die Regulation des Adenylatzyklase Effektorsystems durch Opioidrezeptoren zu erhalten, existieren verschiedene experimentelle Ansätze. So kann die enzymatische Aktivität der Adenylatzyklase an isolierten Plasmamembranen unter definierten Pufferbedingungen durch Messung des Substratumsatzes direkt bestimmt werden (Johnson und Solomon, 1991). Die Bestimmung der intrazellulären cAMP Akkumulation schließt dagegen mannigfaltige intrazelluläre Regulationsmechanismen mit Auswirkungen auf Bildung und Abbau von cAMP mit ein.

Zur Quantifizierung des gebildeten cAMP stehen ebenfalls verschiedene Methoden zur Verfügung (Wong, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde ein kompetitiver Radioimmunoassay (RIA) gewählt, in dem ein radioaktiv markierter cAMP-Tracer mit dem zu bestimmenden cAMP um die Bindung an eine limitierende Antikörpermenge konkurriert. Um radioaktives Arbeiten im Labor zu minimieren, stand alternativ ein am Institut etablierter kompetitiver ELISA zur Verfügung.

2.6.1.1 Intrazelluläre cAMP-Akkumulation

Versuchsmedium:

25 mmol/l N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (Hepes)
 500 µmol/l 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)
 0,01 % (m/m) BSA
 gelöst in DMEM (Fa. PAA)

Für den Akkumulationsansatz werden die jeweiligen Testsubstanzen dem Zellkulturmedium zugegeben und anschließend das gebildete intrazelluläre cAMP bestimmt. Intrazelluläre Botenstoffe unterliegen vielfältigen endogenen Regulationsmechanismen, welche einen schnellen Abbau des neu gebildeten cAMP bewirken. Um dies zu verhindern, wird IBMX als wenig spezifischer Inhibitor der Phosphodiesterasen zugegeben (Thomas und Hoffman, 1988). Durch Abstoppen der Reaktion mit Salzsäure werden die Zellen lysiert, wodurch das produzierte cAMP in den Überstand gelangt und anschließend im RIA quantifiziert werden kann.

Kontroll- und mit den jeweiligen Plasmiden transfizierte Zellen wurden gleichmäßig auf eine 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24- bis 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen vor Versuchsbeginn 3 x mit je 250 µl Versuchsmedium gewaschen (Nullpunkteinstellung).

Anschließend wurden die in Medium gelösten Liganden zugegeben und die Zellen für 15 min bei 37°C auf dem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750 µl eiskalter HCl-Lösung (50 mmol/l in H₂O dd) gestoppt.

2.6.1.2 Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität

Membranpuffer:

20 mmol/l	Tris-HCl
300 mmol/l	NaCl
6 mmol/l	MgCl ₂
300 µmol/l	Ro 20/1724
gelöst in H ₂ O dd, eingestellt auf pH 7,4	

Adenylatzyklasepuffer:

70 mmol/l	Tris-HCl
140 mmol/l	NaCl
2,8 mmol/l	MgCl ₂
10 mmol/l	Phosphokreatin
10 U/ml	Kreatinkinase
140 µmol/l	Ro 20/1724
20 µmol/l	GTP
1 mmol/l	ATP
0,02 % (m/m) BSA	
1 mmol/l	IBMX
gelöst in H ₂ O dd, eingestellt auf pH 7,4	

Die Bestimmung der Adenylatzyklaseaktivität erfolgt an isolierten Plasmamembranen in Anwesenheit eines Überschusses an Adenosintriphosphat (ATP) und eines ATP-Regenerationssystems. Für den Versuch wurden Zellen aus einer 75 cm²-Flasche geerntet und Membranen hergestellt. Jeder Ansatz enthielt 10 µg Membranprotein suspendiert in 30 µl Membranpuffer. Dem wurden die Liganden gelöst in 20 µl H₂O dd und 50 µl Adenylatzyklasepuffer zugegeben. Die Reaktion fand bei 32°C im Wasserbad für 10

min statt. Die Reaktionen wurden schließlich durch Zugabe von 500 µl HCl (10 mmol/l in H₂O dd) gestoppt und die Reaktionsgefäße auf ein Eisbad verbracht.

2.6.1.3 Bestimmung von cAMP im RIA

Die Bestimmung des cAMP erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA; Brooker, 1979). Im RIA wird das cAMP durch Antikörperbindung bestimmt. Den Ansätzen wird eine bestimmte Menge radioaktives [¹²⁵J]cAMP als Tracer zugegeben. Dieses konkurriert mit dem zu bestimmenden cAMP in der Probe um die Bindungsstellen eines zugesetzten cAMP-Antikörpers. Je mehr cAMP sich hierbei in der Probe befindet, umso weniger jodiertes cAMP kann dabei an das Antiserum binden. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wird das am Antikörper gebundene [¹²⁵J]cAMP gefällt, die Ansätze gewaschen und die Radioaktivität im γ-Counter bestimmt. Anhand einer Standardkurve kann die in der Probe enthaltene Menge an freiem cAMP errechnet werden.

Inkubationspuffer:

50 mmol/l Natriumacetat
gelöst in H₂O dd, eingestellt auf pH 6,0

3'5'-cyclo-AMP 2'-O-Succinyl-3-[¹²⁵J]Jodotyrosinmethylester

(Fa. Amersham; spez. Akt. 1910 mCi/µmol):
eingestellt auf 8.000 counts per minute (cpm)/100 µl in Inkubationspuffer

Antikörperlösung:

0,05 % (m/m) bovines IgG, RIA-grade, Fa. Sigma-Aldrich
1:17.000 Ziege anti-cAMP-IgG; Fa. Gramsch Laboratories
gelöst in Acetatpuffer

cAMP-Stammlösung:

1 mmol/l cAMP, gelöst in H₂O dd

Für jeden Radioimmunoassay musste eine cAMP-Standardkurve erstellt werden. Die cAMP Stammlösung wurde dabei im Verhältnis 1:1000 vorverdünnt und als Standard II bezeichnet.

Erstellung der Standardreihe:

Konzentration	Mischungsverhältnis	cAMP Gehalt in 100 μ l
A = 1/10 aus Standard II	146 μ l aus Standard II + 1314 μ l	10 pmol
B = 1/3 aus A	366 μ l aus A + 734 μ l	3,3 pmol
C = 1/10 aus A	100 μ l aus A + 900 μ l	1 pmol
D = 1/10 aus B	100 μ l aus B + 900 μ l	333 fmol
E = 1/10 aus C	100 μ l aus C + 900 μ l	100 fmol
F = 1/10 aus D	100 μ l aus D + 900 μ l	33 fmol
G = 1/10 aus E	100 μ l aus E + 900 μ l	10 fmol
H = 1/10 aus F	100 μ l aus F + 900 μ l	3,33 fmol

Die kursiv angegebenen Mengen stehen für den jeweils zugegebenen Inkubationspuffer. Hinter den bezeichnenden Buchstaben der entsprechenden Standards ist die entsprechende cAMP Endkonzentration des Ansatzes angegeben. Pro Ansatz der Standardkurve wurden von jedem Standard je 100 μ l in zwei Polyethylenröhrchen eingesetzt. Zur Erstellung einer vollständigen Standardkurve wurden zusätzlich je zweimal 100 μ l Inkubationspuffer zur Ermittlung der maximalen [125 J]cAMP Bindung durch den Antikörper (B_{\max}) und zwei Reaktionsgefäße mit jeweils 100 μ l Standard II zur Ermittlung der unspezifischen Antikörperbindung (USB) vorbereitet. Weiter wurden zwei Polyethylenröhrchen nur mit 100 μ l der entsprechenden Tracerverdünnung zur Dokumentation der pro Ansatz eingesetzten Aktivität angesetzt.

Zur Bestimmung des cAMP aus den Proben erwies sich der Einsatz eines Volumens von 25 μ l je Probe als geeignet. Jeder Messpunkt wurde im Doppelansatz bestimmt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C ausgeführt. Zunächst wurden je Probenansatz 75 μ l Inkubationspuffer in Polyethylenröhrchen vorgelegt. Dazu wurden jeweils 25 μ l der zu bestimmenden Proben hinzu pipettiert.

Anschließend wurde zu allen Proben und der Standardkurve je 100 µl der Antikörperverdünnung und der [¹²⁵J]-cAMP-Tracer-Lösung zugegeben. Der Anti-cAMP-Antikörper wurde so verdünnt, dass die zugesetzte Antikörpermenge etwa 40-50 % des eingesetzten [¹²⁵J]-cAMP bindet. Nun wurden alle Ansätze zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes zwischen Antikörper und cAMP über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Antigen-Antikörperkomplexe gefällt. Zur Erhöhung der Proteinfraction wurden pro Ansatz 50 µl 5 % BSA (m/m) in Inkubationspuffer zugegeben. Hierdurch sollte eine quantitative Fällung gewährleistet werden (Brooker et al. 1979). Zur Fällungsreaktion wurden 2 ml eiskaltes Ethanol (96 %) zugegeben, gemischt und die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Antikörper-cAMP Komplexe wurden durch Zentrifugation (30 min; 10.000 x g; 4°C) sedimentiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen und die präzipitierte Radioaktivität im γ-Counter (1272 Clinigamma; Fa. LKB) bestimmt.

2.6.2. Bestimmung der MAPK Aktivierung und der Translokation von Signalproteinen im Westernblot

Zur Darstellung einzelner Proteine nutzt man die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches im Polyacrylamidgel. Durch anschließendes Blotting werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Auf dieser sind sie für Antikörper zugänglich und können mittels Immunreaktion detektiert werden.

2.6.2.1 Herstellung von SDS-Proben

Probenpuffer nach Laemmli:

62 mmol/l	Tris-HCl
10 % (v/v)	Glycerol
1% (m/m)	SDS
6 % (v/v)	10%ige (m/m) Bromphenolblaulösung in Ethanol
350 mM	DTT
ad 1000 µl H ₂ O dd, pH 7,25	

Die Elektrophoreseproben bestanden aus zweifach konzentrierten Laemmli-Puffer

(Laemmli, 1970) und 2 µg/µl Membranprotein in H₂O gelöst. Die Proteine wurden durch zehnmünütiges Erhitzen auf 62°C denaturiert. 10 µl der Proben wurden pro Geltasche aufgetragen.

2.6.2.2 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Trenngel (A):

2,5 ml	Rotiphorese®-Gel 30 (Fa. Roth; 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)
375 mmol/l	Tris-HCl
0,1 % (m/m)	SDS
7,5 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
37,5 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
gelöst in 7,5 ml H ₂ O dd, eingestellt auf pH 8,8	

Sammelgel (B):

8,5ml	Rotiphorese®-Gel 30
125 mmol/l	Tris-HCl
0,1% (m/m)	SDS
10 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
50 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
gelöst in 5 ml H ₂ O dd, eingestellt auf pH 6,8	

In eine Gelkammer (Mini-Protean II, Fa. Bio-Rad) wurde ein Trenngel von 5 x 8 cm gegossen, an dessen oberen Ende sich ein 3 x 8 cm hohes Sammelgel anschloss.

2.6.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Laufpuffer:

25 mmol/l	Tris-HCl
190 mmol/l	Glycin
0,1% (m/m)	SDS

gelöst in H₂O dd, keine pH-Wertseinstellung nötig

In die Taschen des Sammelgels wurden 10 µl der jeweiligen Proben aufgetragen. Pro Gel wurde eine Tasche mit biotinylierten Proteinstandards mit bekanntem Molekulargewicht beschickt (SDS Page Standards; Broad Range; Fa. Bio-Rad). Die Gele wurden in die Laufkammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde zweiphasig bei 120 V während des Sammellaufes und 200 V zur Auftrennung der Proteine durchgeführt.

2.6.2.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen

Anodenpuffer I:

250 mmol/l Tris-HCl
20 % (v/v) Methanol
gelöst in H₂O dd

Anodenpuffer II:

25 mmol/l Tris-HCl
20 % (v/v) Methanol
gelöst in H₂O dd

Kathodenpuffer:

40 mmol/l ε-Aminocaprylsäure
20 % (v/v) Methanol
gelöst in H₂O dd

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS/T):

25 mmol/l Tris-HCl
190 mmol/l NaCl
1 % (v/v) Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween-20)
gelöst in H₂O dd, eingestellt auf pH 8,0

Blocklösung:

5 % (m/m) BSA
gelöst in TBS/T, pH 8,0

Um einen möglichst quantitativen Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P®, Fa. Millipore) zu erreichen, wurde der Westernblot im Semidry-Verfahren mit diskontinuierlichem Puffersystem durchgeführt. Für jedes SDS-Polyacrylamidgel wurde eine 5 x 8 cm große Membran durch zehnminütiges Einlegen in Methanol und anschließend in H₂O dd hydratisiert. Bis zum Gebrauch erfolgte die Lagerung in Anodenpuffer II.

Die Gele wurden nach dem Lauf aus der Kammer entnommen und nach ihrer Markierung ebenfalls in Anodenpuffer II gelegt. Auf eine gewässerte Graphitelektrode wurden sechs in Anodenpuffer I getränkte Filterblätter gelegt, darauf drei, die in Anodenpuffer II getränkt waren. Es folgten die Membran und anschließend die Gele. Den Abschluss des Stapels bildeten neun in Kathodenpuffer getränkte Filterblätter und die zweite Graphit-elektrode. Bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran für 2 Stunden erfolgte der Proteintransfer auf die Membran. Anschließend wurden die Bindungsstellen der Membranen durch einstündige Inkubation mit Blocklösung abgesättigt.

2.6.2.5 Immunchemische Proteindetektion

Für die Inkubation der Membranen mit spezifischen Antikörpern wurde TBS/T mit 0,1 % (m/m) BSA versetzt und die Antikörper darin gelöst. Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht mit dem primären, gegen das jeweilige Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für je 10 min mit TBS/T erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers während einer Stunde.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

Zielprotein	Herkunftsspezies	Hersteller
FLAG-Tag	Maus (monoklonal)	Fa. Sigma-Aldrich
Phospho-p44/42-MAPK	Kaninchen	Fa. Cell Signaling
p44/42-MAPK	Kaninchen	Fa. Cell Signaling
β-Untereinheit/GRK2	Kaninchen	Prof. Dr. Ammer

β -Arrestin 1	Maus (monoklonal)	Fa. BD Transduction Lab.
---------------------	-------------------	--------------------------

Folgende sekundäre, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper wurden verwendet:

Kaninchen-IgG	Ziege	Fa. Promega
Maus-IgG	Ziege	Fa. Promega
Biotin	Ziege	Fa. Cell Signaling

2.6.2.6 Chemilumineszenz

Substratlösung:

2,5 mM	Luminol (3-Aminophtalhydrazid) in DMSO
400 μ M	p-Cumarsäure in DMSO
100 mM	Tris-HCl
2,7 mM	30% H_2O_2

gelöst in H_2O dd, eingestellt auf pH 8,5

Die Antigen-Antikörperkomplexe wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dabei wird Luminol durch die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert. Fällt das Luminol nach dieser chemischen Aktivierung wieder in den Grundzustand zurück, wird Energie in Form von Licht ausgesendet, die durch Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden kann.

Die gewaschenen PVDF Membranen wurden für 1 min die Substratlösung gelegt, in eine Röntgenkassette verbracht und ein Röntgenfilm (HyperfilmTM; Fa. Amersham Biosciences) damit belichtet. Nach einer Expositionszeit von ca. 1 – 5 min wurden die Filme entwickelt und im Video-Imager (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab) dokumentiert und ausgewertet.

2.7 Auswertung der Ergebnisse

Jedes Experiment wurden mindestens an 3 separat transfizierten Zellpopulationen wiederholt. Jeder Versuch wurde in Zwei- oder Dreifachbestimmung durchgeführt, aus deren Messwerten das arithmetische Mittel gebildet wurde. Aus den Ergebnissen aller Versuche wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Datenauswertung wie auch die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm Excel, Fa. Microsoft. Die Auswertung und Darstellung der Dosis-

Wirkungs-Kurven erfolgte ebenfalls mit dem Programm GraphPad Prism.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zellsystem

3.1.1 Etablierung stabiler COS μ -Klone

3.1.1.1 Herstellung von Plasmid pCEP- μ OR

COS-7 Zellen sind zur episomalen Replikation von Plasmiden befähigt, die den SV40 „origin of replication“ enthalten. Sie stellen daher ein ideales Modell zur transienten Expression von Proteinen dar. Diese Eigenschaft erschwert es dagegen, die Zellen stabil zu transfizieren (Gluzman, 1981). Deshalb wurde die kodierende Sequenz des μ -Opioid-rezeptors in das Plasmid pCEP4 subkloniert. Diesem fehlt der SV40 „origin“, wodurch das Plasmid nicht episomal repliziert und daher stabil in das Genom eingebaut werden kann. Obwohl bei der Erstellung des Plasmids der Einbau des Inserts in den Vektor in richtiger Orientierung durch Verwendung zweier verschiedener Restriktionsenzyme gewährleistet war, wurde die Integrität des erstellten Plasmids pCEP- μ OR mittels Restriktionsverdau kontrolliert. Hierzu wurde das Enzym XhoI verwendet, das an zwei Stellen im Plasmid pCEP- μ OR schneidet. Diese liegen bei richtiger Orientierung des Inserts direkt nebeneinander, so dass in diesem Fall der Vektor linearisiert wird. Bei inverser Orientierung des Inserts würden beim Restriktionsverdau zwei sichtbare Fragmente entstehen. Das Ergebnis dieses Restriktionsverdaus ist in Abbildung 7 gezeigt:

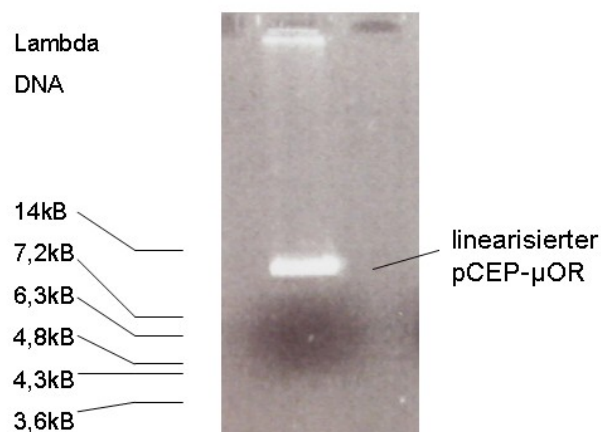


Abb.7: Auftrag des linearisierten Plasmids pCEP- μ OR

3.1.1.2 Bestimmung der Sensitivität von COS-7 Zellen gegenüber Hygromycin

Für die stabile Transfektion von COS-7 Zellen war es nötig, diejenige Konzentration des Selektionsantibiotikums Hygromycin zu bestimmen, die geeignet ist, nicht stabil transfizierte Zellen abzutöten. Das Plasmid pCEP4 enthält ein Resistenzgen für Hygromycin, das nach stabiler Integration in das Genom das Überleben der Zellen in Anwesenheit von Hygromycin im Kulturmedium sichert.

COS-7 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an Hygromycin behandelt. Ab einer Konzentration von 200 µg/ml Hygromycin waren über 50% der Zellen abgestorben. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde zur Selektion stabil transfizierten COS-7 Zellen eine Konzentration von 400 µg Hygromycin/ml Medium gewählt, während die Erhaltungsdosis für stabile COS μ -Zellen 200 µg/ml betrug.

3.1.1.3 Transfektion von COS-7 Zellen

Mit der Methode der Calcium-Phosphat-Copräzipitation wurden tags zuvor ausgesäte COS-7 Zellen mit 10 µg des Plasmids pCEP- μ OR transfiziert.

3.1.1.4 Selektion

Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Zugabe von 400 µg Hygromycin/ml mit der Selektion begonnen. Nach mehreren Tagen mit wiederholtem Mediumwechsel wurden unter dem Mikroskop aus den sich entwickelnden Kolonien Zellen isoliert und je Kolonie auf eine Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät. Gut proliferierende Kolonien wurden in 25 cm²-Kulturflaschen weiter vermehrt, anschließend auf 75 cm²-Flaschen ausgesät und mittels Radioligandenbindung auf Rezeptorexpression untersucht.

3.1.1.5 Subklonierung

Die Zelllinie mit der höchsten Rezeptorexpression (C3) wurde nochmals stark verdünnt auf eine 60 cm²-Kulturschale ausgesät. Nach einer erneuten Selektion mit 400 µg Hygromycin/ml Medium konnten mehrere Klone isoliert und mittels Radioligandenbindung auf ihren Rezeptorgehalt hin untersucht werden.

3.1.1.6 Bestimmung der Rezeptordichte mittels Radioligandenbindung

Von den einzelnen Klonen wurden Membranen präpariert und diese für die Radioligandenbindung verwendet. Da die Dissoziationskonstante (K_d) für ^3H -Diprenorphin in diesem Zellsystem noch unbekannt war, wurde für die Berechnung der maximalen Bindungskapazität die in anderen Systemen bestimmte K_d für ^3H -Diprenorphin am μ -Opioidrezeptor von 1,4 nmol/l verwendet. Dies war für den ersten Selektionschritt ausreichend, da die Rezeptordichte der einzelnen Klone lediglich miteinander verglichen werden sollte. Die drei ursprünglich isolierten Zelllinien enthielten 404 (C1), 486 (C3) und 418 fmol Rezeptoren pro mg Membranprotein (C4). Nach der Subklonierung von Zelllinie C3 wurden insgesamt sechs Klone auf ihren Rezeptorgehalt hin untersucht. Sie wiesen Expressionsraten von 843 bis 1216 fmol Rezeptoren pro mg Membranprotein auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Klon b3 zeigte einen Rezeptorgehalt von 1216 fmol/mg Membranprotein und wurde für die Durchführung der weiteren Versuche ausgewählt. Dieser Zellklon wurde mit „COS μ “ bezeichnet und ein größerer Vorrat in flüssigem Stickstoff angelegt.

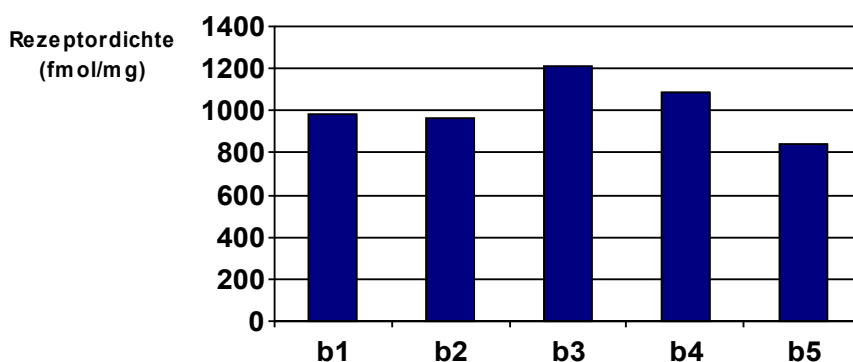


Abb. 8: Rezeptorexpression der COS μ -Klone b1, b2, b3, b4 und b5

3.1.1.7 Darstellung der Rezeptoren mittels Immunfluoreszenz

Zur Visualisierung der Rezeptoren wurde der ausgewählte Zellklon auf Glas-Coverslips kultiviert und nach Fixierung durch Formalin mit Triton X-100 permeabilisiert. Der Rezeptor

wurde mit einem Antikörper gegen den C-Terminus des μ -Opioidrezeptors und einen FITC-gekoppelten sekundären Antikörper markiert. Abbildung 9 zeigt eine mittels konfokaler Mikroskopie erstellte Aufnahme. Neben der erwarteten Membranlokalisation fällt eine deutliche Anfärbung von Rezeptoren im Zytosol auf. Hierbei handelt es sich aufgrund der hohen Rezeptorexpression höchstwahrscheinlich nicht um internalisierte, sondern um neu synthetisierte Rezeptoren, die in Vesikeln zur Verbringung auf die Zelloberfläche vorliegen.

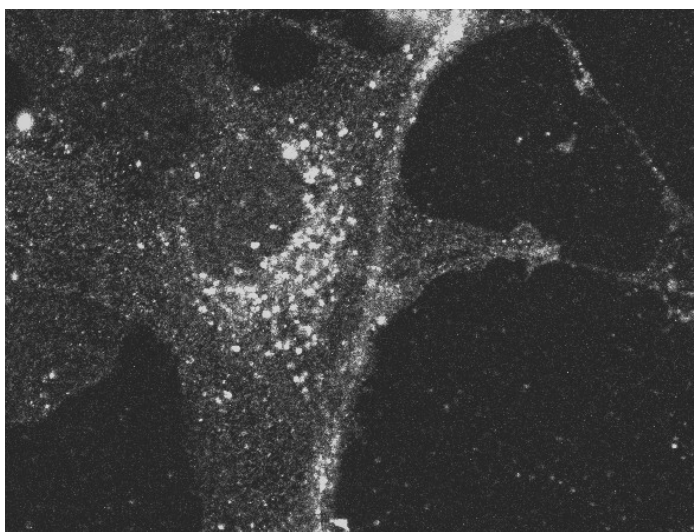


Abb. 9: Konfokale Aufnahme von μ -Opioidrezeptoren in COS μ -Zellen. Die Aufnahme wurde mit dem Mikroskop LSCM 510 der Firma Zeiss erstellt. Neben der Membranlokalisation ist der hohe intrazelluläre Rezeptorenhalt dieser Zelllinie erkennbar.

3.1.1.8 Pharmakologische Charakterisierung des μ -Opioidrezeptors

Um die neu erstellte COS μ -Zelllinie für die Versuche nutzen zu können, mussten die Bindungseigenschaften des μ -Opioidrezeptors charakterisiert werden. Hierzu wurden Sättigungsexperimente durchgeführt, bei denen Membranen von COS μ -Zellen mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden ^3H -Diprenorphin inkubiert wurden. Die gewonnenen Daten ergaben eine hyperbolische Funktion, aus der sich die maximale Bindungskapazität B_{max} sowie die Dissoziationskonstante K_d bestimmen lässt. Für den μ -Opioidrezeptor in COS μ -Zellen wurde dabei eine B_{max} von 1129 fmol/mg Membranprotein und eine K_d für Diprenorphin von 2,3 nmol/l ermittelt. Identische Bindungsparameter ergaben sich nach Scatchard-Transformation der Daten (siehe Abbildung 10).

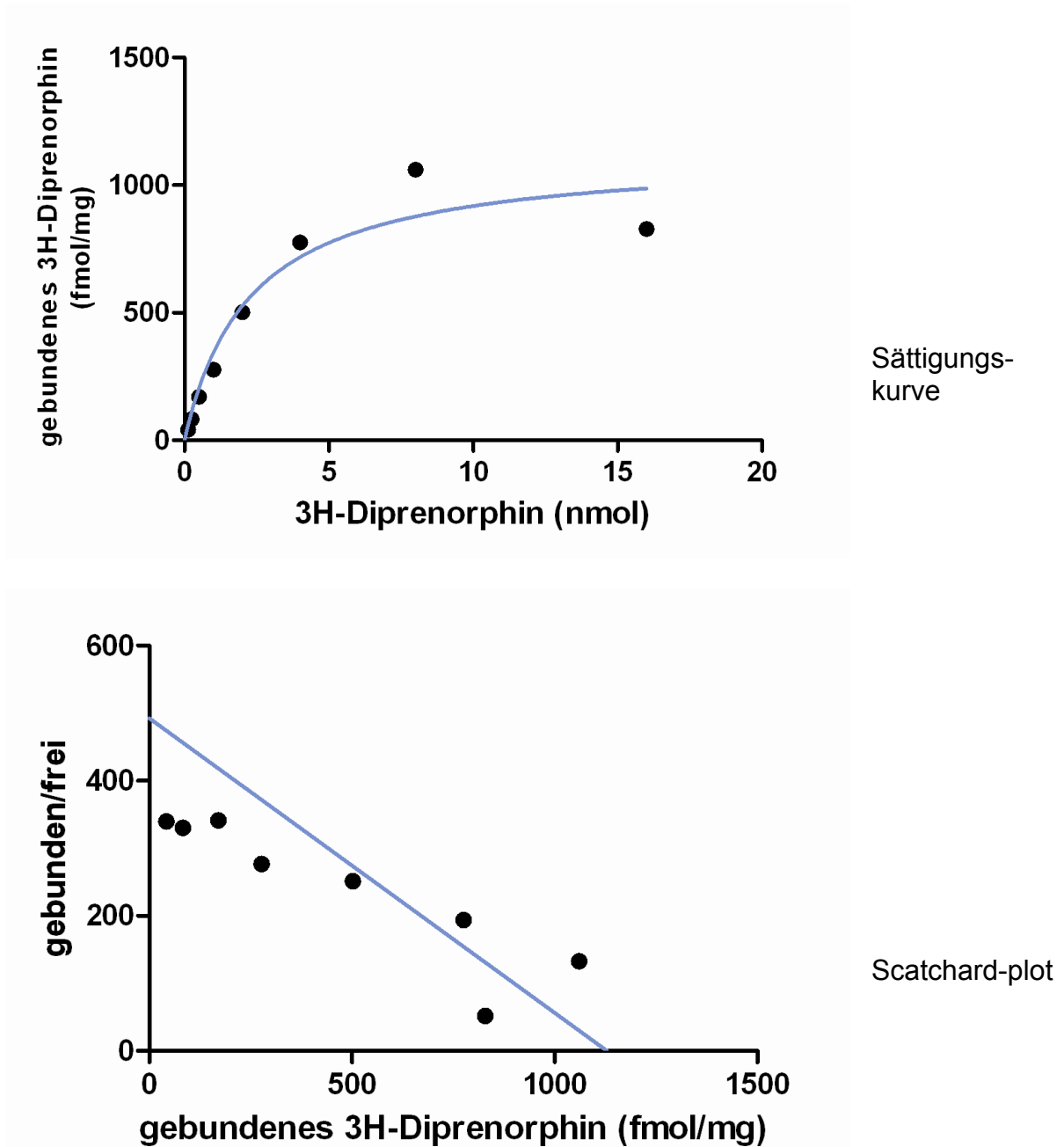


Abb. 10: Sättigungskurve und Scatchard-Plot für ³H-Diprenorphin an COSμ-Zellen. Die Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen an ³H-Diprenorphin inkubiert und nach Filtration die gebundene Radioaktivität bestimmt. In der oberen Grafik ist die spezifische Diprenorphinbindung gegen die eingesetzte Radioligandenkonzentration aufgetragen. Die Sättigungskurve nähert sich einem Plateau, das der B_{\max} von 1129 fmol/mg entspricht.

In der unteren Grafik wurden die Bindungsdaten nach Scatchard-Transformation aufgetragen, wobei das Verhältnis von gebundenem zu freiem Radioligand berechnet und gegen die das gebundene Diprenorphin aufgetragen wurde. Die Steigung der Gerade entspricht dem negativ reziproken Wert der K_d . Der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht der maximalen Bindungskapazität (B_{\max}).

3.1.2 Herstellung der Adenylatzyklasekonstrukte

3.1.2.1 Auswahl der Primer

Zur Bestimmung der Konsensussequenzen für die „vorwärts“ und „rückwärts“ Primer wurden die Gensequenzen der Adenylatzyklasen vom Typ II und V (GI:13591905 bzw. 456756) und des T-Zell-Rezeptors CD8 (GI:179145) aus der NCBI Entrez Nucleotide Datenbank bezogen. Innerhalb der Gensequenzen wurden die Grenzen zwischen der ersten transmembranen, ersten intrazellulären sowie der zweiten transmembranen und intrazellulären Domäne (M1, C1, M2 und C2) bestimmt. Als Anhaltspunkte hierfür dienten entsprechende Literaturangaben für ACII (Yan et al., 1996) bzw. ACV (Scholich et al., 1997). Als nächstes wurde beurteilt, ob die direkt am 5'- bzw. 3'-Ende der jeweiligen Domänen gelegene DNA-Sequenz als Primer geeignet war: Dazu sollten alle vier Nukleotide (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) in einem ausgeglichenen Verhältnis vorliegen und gleichmäßig über den Sequenzabschnitt verteilt sein. Außerdem sollten die ausgewählten Sequenzabschnitte spezifisch für den jeweiligen Bereich sein, um eine unerwünschte Primerbindung auszuschließen. Die Auswahl der Primer erfolgte mithilfe des Computerprogramms IDT SciTools OligoAnalyzer 3.0 (Fa. Integrated DNA Technologies). Das Programm gestattet auch die Überprüfung der Primer auf Bildung möglicher Haarnadelstrukturen oder Primerdimerisierung. Bei allen vier zu amplifizierenden Fragmenten (ACIIC1 und C2, ACVC1 und C2) konnten alle acht Primer direkt abgeleitet werden, da die Sequenzen alle genannten Bedingungen erfüllten. Von der CD8-T-Zell-Rezeptor cDNA (GI:179145) (Littman et al., 1985) wurden die ersten 600 Nucleotide bestimmt und die Primer von 5'- und 3'-Ende dieser Sequenz abgeleitet. Bei der Auswahl der Primer wurde zudem darauf geachtet, dass der Leserahmen in den Konstrukten intakt bleibt. An die ausgewählten Komplementärsequenzen wurden zusätzlich noch Schnittstellen, Randsequenzen, Start- und Stoppcodons sowie ein FLAG-Tag (CD8 „vorwärts“ Primer) angehängt. Die Restriktionsstellen wurden so gewählt, dass das CD8-Fragment in die HindIII- und XhoI-Schnittstelle der „multiple cloning site“ des Plasmids pcDNA3.1(+) eingebaut werden konnte. Im Anschluss daran konnten die Fragmente der Adenylat-zyklasen in die XhoI- und XbaI-Schnittstellen des Plasmids eingefügt werden. Durch die Elimination interner Stoppcodons wurde das Ablesen des vollständigen Konstruktes ermöglicht. Das translatierte Protein bestand aus dem transmembranären

Anteil von CD8 als Membrananker und einer zytosolischen Domäne der jeweiligen Adenylatzyklasen. Abbildung 11 veranschaulicht den Aufbau der Konstrukte.

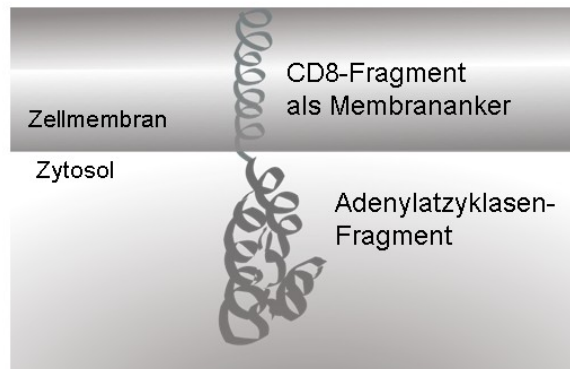


Abb. 11: Halbschematische Darstellung der Lokalisation des translatierten Konstruktes in der Zelle (Grafik erstellt mit dem Programm Inkscape, Free Software Foundation, Inc.)

3.1.2.2 PCR und Ligation

Die PCR wurde für alle Fragmente nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, lediglich die Anlagerungstemperaturen wurden je nach Schmelztemperatur der Primer im Bereich von 50 bis 60°C variiert. Die PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle und gleichzeitigen Aufreinigung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die aus dem Agarosegel isolierten DNA-Fragmente wurden mittels Millipore-Säulchen aufgereinigt. Anschließend wurden die Amplifikate und der Vektor pcDNA3.1(+) mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Vorgehensweise bei der Erstellung der Konstrukte war derart, dass zunächst der CD8-Membrananker in den Vektor pcDNA3.1(+) ligiert wurde. Das daraus entstandene Plasmid CD8-pcDNA wurde vermehrt und mittels Restriktionsverdau kontrolliert. Nun wurde in dieses Plasmid das ACVC1-Fragment eingebracht. Das erstellte Plasmid CD8-VC1 wurde ebenfalls vermehrt und diente als Ausgangsplasmid für die weiteren Vektoren, indem das ACVC1-Fragment durch die jeweiligen Abschnitte der anderen Adenylatzyklasen ersetzt wurde. Dies hatte den Vorteil, dass das herausgeschnittene Fragment in der Agarosegel-Elektrophorese erkennbar war und somit das richtige Öffnen des Vektors kontrollierbar war. Auf diese Weise wurden die

restlichen drei Vektoren hergestellt. Ein Beispiel für ein Agarosegel, auf das PCR-Produkte sowie ein geöffneter Vektor aufgetragen sind, ist in Abbildung 12 dargestellt.

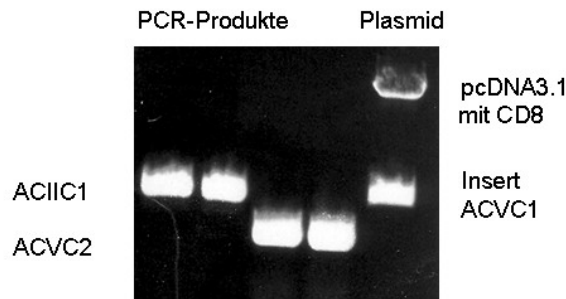


Abb. 12: Agarosegel-Elektrophorese mit Auftrag von vier PCR-Ansätzen (Adenylatzyklase-konstrukte ACIIC1 und ACVC2; erste vier Spalten) und dem Restriktionsverdau eines Plasmids (pcDNA3.1-CD8, herausgeschnitten wurde das Fragment ACVC1, fünfte Spalte)

3.1.2.3 Kontrolle der Konstrukte mittels Restriktionsverdau

Alle vier Vektoren, pcDNA3.1(+) mit den Inserts CD8-IIC1, CD8-IIC2, CD8-VC1 und CD8-VC2 wurden mittels Restriktionsverdau überprüft. Dabei wurden die eingefügten Konstrukte vollständig oder teilweise mithilfe von geeigneten Enzymen aus dem Vektor herausgeschnitten. Alle Ansätze zeigten dabei in der Agarosegel-Elektrophorese Banden, die den erwarteten Längen der DNA-Fragmente entsprachen. Abbildung 13 zeigt einen Kontrollversuch für die Plasmide CD8-IIC1 und -VC2.

3.1.2.4 Expression der Konstrukte in COS-7 Zellen

Um zu kontrollieren, ob die DNA-Konstrukte für vollständige Fusionsproteine kodieren, wurden COS-7 Zellen mit den Plasmiden mittels des Transfektionsagens Roti-Fect® transfiziert. Von den geernteten Zellen wurden Membranen präpariert und diese auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Konstrukte wurden mit einem FLAG-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG der Firma Promega nachgewiesen. Alle exprimierten Konstrukte wurden mit dem FLAG-Antikörper angefärbt. Die Größe der Fusionsproteine entsprach darüber hinaus den erwarteten Molekulargewichten. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Erkennungssequenz des

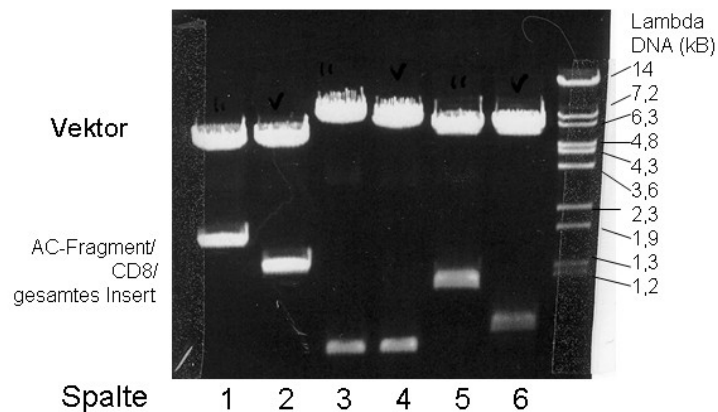


Abb. 13: Auftrennung mehrerer Restriktionsansätze über ein Agarosegel. Die Spalten 1, 3 und 5 enthalten das Plasmid pcDNA3.1 mit CD8-ACIIC1, die Spalten 2, 4 und 6 das entsprechende Plasmid mit CD8-ACVC2. Die Ansätze in Spalte 1 und 2 wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI inkubiert, wodurch das vollständige CD8-Adenylatzyklasenfragment aus dem Vektor herausgeschnitten wurde. Die Spalten 3 und 4 zeigen, dass die Enzyme HindIII und XhoI nur das CD8-Fragment herauschneiden, während in den Spalten 5 und 6 die Enzyme XhoI und XbaI nur die Adenylatzyklasefragmente isolieren. Die Größen der CD8- (0,6 kB), ACIIC1- (1,1 kB), ACVC2-Fragmente (0,7 kB) sowie des leeren Vektors (5,4 kB) wurden durch Vergleich mit dem Längenstandard abgeschätzt.

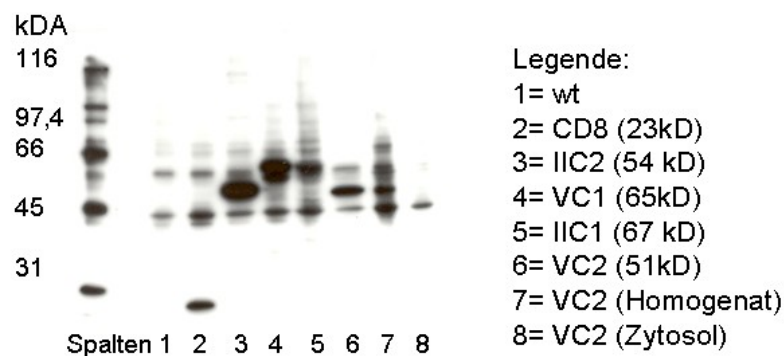


Abb.14: Westernblot von COS-7 Zellen, die mit verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden. Aufgetragen wurden je 10 µg Membranprotein, mit Ausnahme der Spalten 7 und 8, in denen entsprechende Mengen an Zellhomogenat und Zytosol verwendet wurden. Der FLAG-Antikörper färbt bereits bei nicht transfizierten Zellen (Wildtyp; wt) zwei unspezifische Banden an, die auch in allen transfizierten Zellen zu finden sind. Die spezifischen Banden heben sich davon jedoch deutlich ab und können aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts leicht zu erkannt werden. Während im Zellhomogenat die spezifische Bande des Konstrukts CD8-ACVC2 erkennbar ist, fehlt sie im Zytosol.

FLAG-Antikörpers als auch der vollständige Leserahmen der Konstrukte korrekt translatiert wurde. Auch wurden die Fusionsproteine in die Zellmembran eingebaut. In Kontrollversuchen konnte keines der Fragmente im Zytosol nachgewiesen werden. Somit ist das CD8-Fragment als Membrananker für die Expression zytosolischer Domänen der Adenylatzyklasen geeignet. Ein repräsentativer Westernblot ist in Abbildung 14 gezeigt.

3.2 Funktionelle Charakterisierung der Adenylatzyklasekonstrukte

3.2.1 Enzymatische Aktivität der Konstrukte

Um eine mögliche Rekonstitution der enzymatischen Aktivität nach Expression der Konstrukte in COS μ -Zellen zu testen, wurde zunächst die durch Forskolin stimulierte Aktivität der Adenylatzyklase in Zellmembranen bestimmt. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigte keines der Konstrukte eine eigene enzymatische Aktivität. Dies bedeutet, dass die transfizierten Fusionsproteine nicht mit der endogenen Adenylat-zyklase IX interagieren. Wurden dagegen verschiedene Kombinationen komplementärer C1- und C2-Fragmente cotransfiziert, so konnte im Falle einer Coexpression von IIC1 und IIC2 ein deutlicher Anstieg der cAMP Produktion beobachtet werden. Dies entsprach den Erwartungen, da bekannt ist, dass C1- und C2-Hälften von Adenylat- und Guanylat-zyklasen nötig sind, um ein katalytisch aktives Protein zu bilden (Weitmann et al., 1999). Die Expression der vollständigen Adenylatzyklaseisoformen II und V führte jeweils zu einer Zunahme der Forskolin-stimulierten cAMP Produktion.

Darüber hinaus wurde die Regulation der Fusionsproteine durch Opioidrezeptoren untersucht. COS-7 Zellen verfügen nur über die nicht durch inhibitorische G-Proteine regulierte Adenylatzyklase IX, weshalb die gewonnenen Daten nur die Funktion der eingebrachten Adenylatzyklasefragmente widerspiegeln. Hierfür wurden COS μ -Zellen mit den einzelnen Konstrukten bzw. deren Kombinationen transfiziert und die akute Hemmung der Forskolin-stimulierten Aktivität sowie die Ausbildung chronischer Opioideffekte durch Morphin bestimmt. Wie in Abbildung 16 gezeigt, ist die Expression des Membranankers CD8 alleine sowie die der IIC2- bzw. VC1-Konstrukte in COS μ - Zellen nicht in der Lage, eine Morphin-vermittelte Hemmung der cAMP Produktion zu induzieren. Im verwendeten Zellsystem findet also keine funktionelle Dimerisierung des VC1-Konstruktes mit der endogenen Adenylatzyklase vom Typ IX statt. Chronische

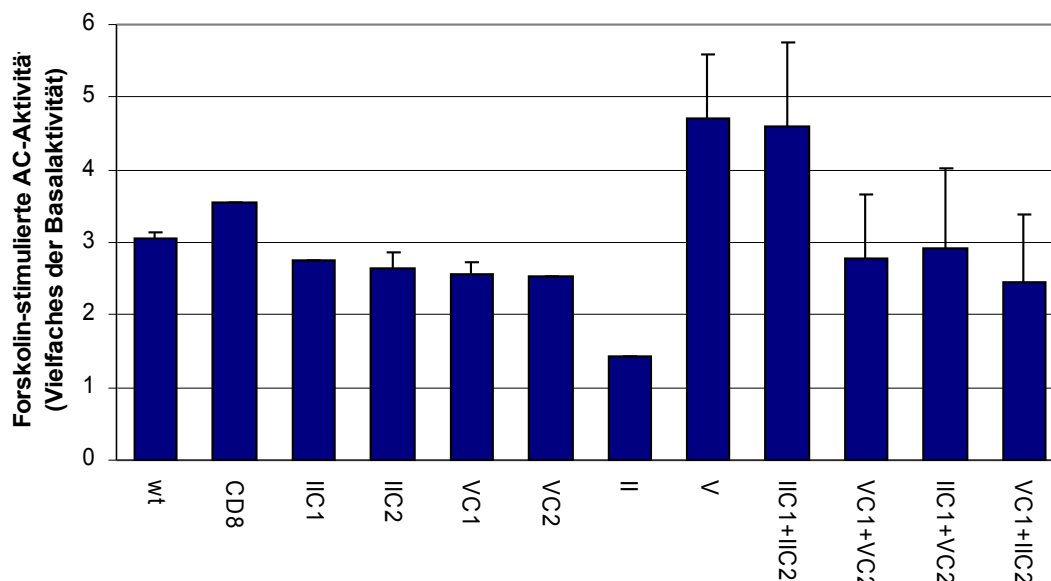


Abb. 15: Aktivitätserhöhung der Adenylatzyklase nach Stimulation mit Forskolin. COS μ -Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die den transmembranären Teil des T-Zell-Rezeptors alleine (CD8), die Konstrukte CD8-ACIIC1, -IIC2, -VC1 und -VC2 (mit IIC1 usw. bezeichnet) und die gesamten Adenylatzyklasen II und V enthielten, sowie mit Kombinationen komplementärer Adenylatzyklasehälften. Die Stimulation der Adenylatzyklase erfolgte mit 10 μ mol/l Forskolin. Das gebildete cAMP wurde mittels RIA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der Basalaktivität ausgedrückt und stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Versuchen dar.

Opioidwirkungen werden deshalb nicht ausgebildet. Nach Transfektion der Adenylatzyklase II dagegen ist in den Zellen ein Anstieg der akuten μ -Opioidezeptor vermittelten Adenylatzyklaseaktivität zu beobachten (Stimulation der Adenylatzyklase II durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten). Dieser Effekt desensibilisiert nach chronischer Morphinapplikation. Werden COS μ -Zellen mit Adenylatzyklase V transfiziert, führt die Aktivierung des μ -Opioidezeptors zu einer deutlichen Hemmung der cAMP Produktion. Im Verlauf einer chronischen Morphinbehandlung bildet sich auch hiergegen Toleranz aus. Versucht man durch Kotransfektion zweier komplementärer Adenylatzyklasehälften ein funktionelles System zu rekonstituieren, so ist Morphin in der Lage, die cAMP Produktion in Anwesenheit von VC1 und VC2 zu hemmen. Auch dieser Effekt desensibilisiert wiederum

nach chronischer Morphinbehandlung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

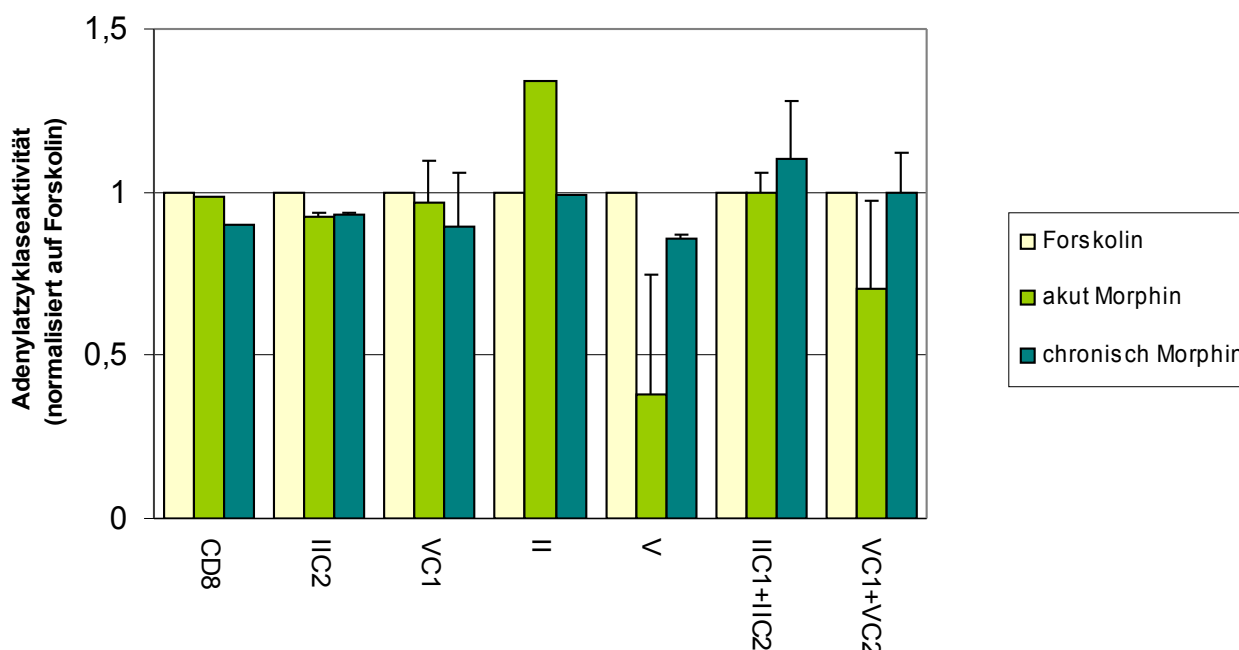


Abb. 16: Regulation der Adenylatzyklaseaktivität in transfizierten COS μ -Zellen. COS μ -Zellen wurden mit dem transmembranären Teil des T-Zell-Rezeptors alleine (CD8), mit den Konstrukten ACIIC2 und -VC1, den vollständigen Adenylatzyklasen II und V sowie mit Kombinationen komplementärer Adenylatzyklasehälften transfiziert. Die Stimulation der Adenylatzyklase erfolgte mit 10 μ mol/l Forskolin. Morphin wurde in einer Konzentration von 1 μ mol/l eingesetzt. Zur Induktion chronischer Opioideffekte wurden die Zellen für 24 Stunden in Anwesenheit von Morphin inkubiert. Das gebildete cAMP wurde mittels RIA bestimmt. Die Ergebnisse sind im Verhältnis zur Forskolin-stimulierten Adenylatzyklaseaktivität dargestellt und stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

3.2.2 Nachweis von „scavenger“ und „feedback“ Funktionen der Konstrukte

Um die Effekte der Konstrukte auf die Regulation der Rezeptor/Adenylatzyklase-Interaktion zu untersuchen, wurden NG108-15 Zellen mit diesen transfiziert und die Zellen einer akuten und chronischen Morphinbehandlung unterzogen. NG108-15 Zellen enthalten keine Adenylatzyklase I und II, dafür aber Adenylatzyklase V, die durch inhibitorische G-Proteine hemmbar ist. Bei den nicht transfizierten Zellen (wt; siehe Abbildung 17) führt die akute Zugabe von Morphin zu einer Hemmung der cAMP Produktion. Nach chronischer Morphinexposition desensibilisiert der akute Effekt und die

initial gehemmte Adenylatzyklaseaktivität kehrt wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück (Toleranz). Die chronische Morphinapplikation führt auch zur Ausbildung von Abhängigkeit, die durch eine überschießende cAMP Produktion (2fach) im Opioidentzug gekennzeichnet ist (Supersensitivität der Adenylatzyklase). Bei Zellen, die mit dem Plasmid ACIIC1 transfiziert wurden, ist nach akuter Zugabe von Morphin nach wie vor eine Hemmung der cAMP Produktion zu beobachten. Dagegen ist nach chronischer Morphinbehandlung die Ausbildung der Supersensitivität unterbunden. Die Anwesenheit von ACIIC2 bewirkt ebenfalls keinen Einfluss auf die akute Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität, dagegen führt eine chronische Morphinbehandlung bereits im Stadium der Toleranz zu einem starken Anstieg der cAMP Produktion, die auch im Opioidentzug nicht mehr weiter verstärkt wird. Die beiden zytoplasmatischen Domänen der Adenylatzyklase V (ACVC1; ACVC2) führen beide zu einer Abschwächung der akuten Opioidwirkung, während keine deutlichen Einflüsse auf die Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit zu beobachten sind.

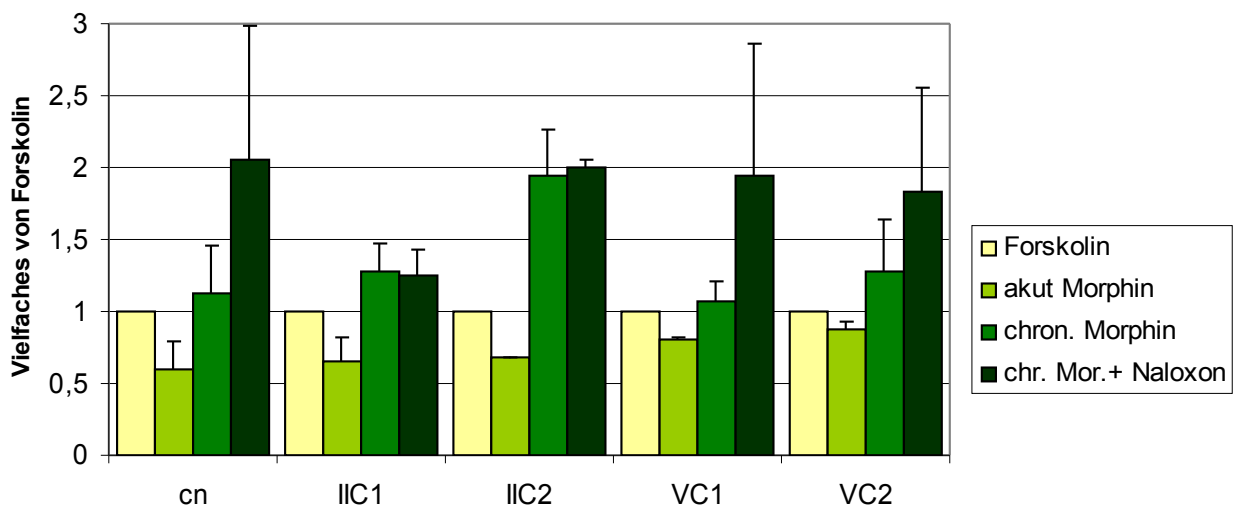


Abb. 17: Beeinflussung der Ausbildung akuter und chronischer Opioidwirkungen durch zytosolische Adenylatzyklasedomänen in NG108-15 Zellen. NG108-15 Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und mit den Konstrukten ACIIC1, -IIC2, -VC1 und -VC2 transient transfiziert. Kontrollzellen (cn) wurden mit dem Membrananker (CD8) alleine transfiziert. Zur Induktion chronischer Opioideffekte wurden die Zellen für 24 Stunden in Anwesenheit von Morphin (1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Die Stimulation der Adenylatzyklase erfolgte mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin. Die akute Hemmung der Adenylatzyklase erfolgte mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Morphin. Chronisch mit Morphin behandelte Zellen wurden entweder in Gegenwart von Morphin (Toleranz) oder

mit Naloxon (1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert (Entzug). Das gebildete cAMP wurde mittels RIA bestimmt. Die Ergebnisse sind im Verhältnis zur cAMP Produktion nach Stimulation mit Forskolin dargestellt und stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Versuchen dar.

3.3 Regulation der μ -Opioidrezeptor-Funktion durch die Adenylatzyklasekonstrukte

3.3.1 GTP γ S-Bindung

Bei der GTP γ S-Bindung wird radioaktiv markiertes GTP, das anstatt des tertiären Phosphors ein Schwefelatom besitzt, in die vom Rezeptor aktivierten G α -Untereinheiten eingebaut. Sie stellt daher ein Maß für die Rezeptor/G-Protein-Interaktion dar.

3.3.1.1 Bestimmung der maximalen G-Protein-Aktivierung

Die akute Aktivierung von Opioidrezeptoren mit DADLE in COS μ -Zellen führt nur zu einer geringen Aktivierung von G-Proteinen (4,4fache Stimulation). Wie in Abbildung 18 dargestellt, geht die Expression sämtlicher vollständiger Adenylatzyklasen (II und V) sowie deren Konstrukte mit einer deutlichen Zunahme der Anzahl der vom Rezeptor aktivierten G-Proteine einher. So wird bei ACII ein 5,6facher Anstieg über den Basalwert beobachtet, ein Effekt, der auch durch die isolierten zytosolischen Domänen IIC1 (4,9fach) und IIC2 (6,5fach) initiiert wird. Die Zunahme der G-Protein-Aktivierung fällt in Anwesenheit von ACV deutlicher aus (7,9fach), welche von den beiden Konstrukten VC1 (5,8fach) und VC2 (5,9fach) nicht ganz erreicht wird. Die chronische Morphinbehandlung führt in Kontrollzellen zu einem Anstieg der Rezeptor/G-Protein-Kopplung um das 2,6fache. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit intakter Adenylatzyklasen (ACII: 3,5fach; ACV: 3,0fach), nicht aber durch die der Konstrukte (IIC1: 3,2; IIC2: 2,4; VC1: 1,7; VC2: 2,8) verstärkt. Wird die akute Rezeptoraktivierung in chronisch Morphin vorbehandelten Zellen untersucht, so bleibt die absolute Stimulierbarkeit der G-Proteine in der Kontrollgruppe unverändert. Aufgrund der erhöhten basalen Aktivität kommt dies einer Desensibilisierung der Rezeptoren gleich (1,5 vs 4,4fache Stimulation über basal). Die Expression von ACII führt zu einer starken Erhöhung der G-Protein-Aktivierung (7,3fach), die über das Niveau der naiven Zellen hinausgeht. Die Adenylatzyklase V sowie die Konstrukte IIC1, IIC2 und VC1 weisen diese Zunahme nicht auf, die maximale G-Protein-Aktivierung entspricht

derjenigen naiver Zellen (Plateau). Die Expression von VC2 führt dagegen zu einer absoluten Abnahme der GTPγS-Bindung in vorbehandelten Zellen (4,8 vs. 5,9fach in naiven Zellen).

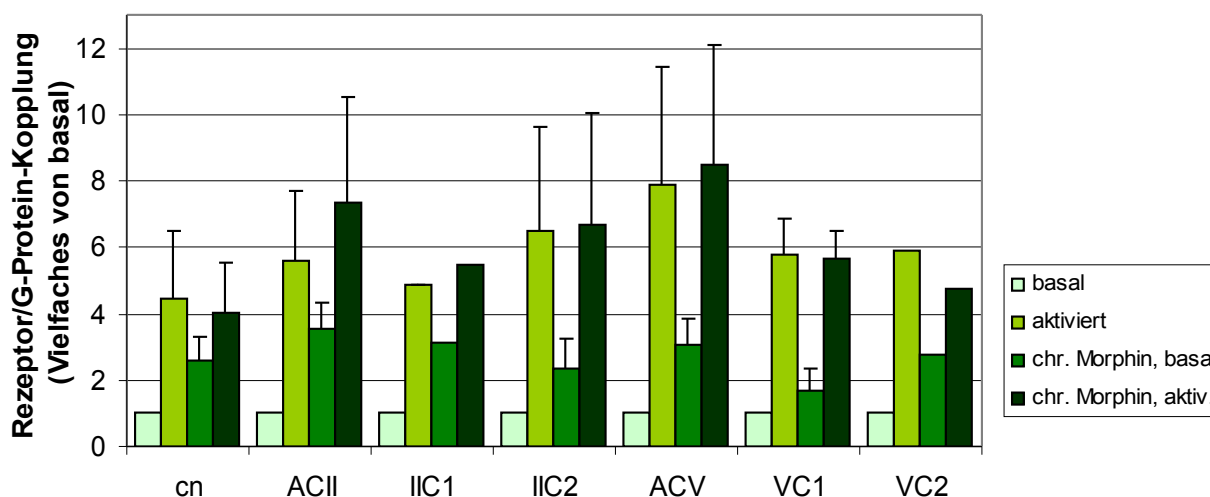


Abb. 18: [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membranen von COSμ-Zellen. Die Zellen wurden transfiziert und auf 150 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Zur Induktion chronischer Opioideffekte wurden die Zellen für 24 Stunden mit Morphin (1 μmol/l) behandelt. Die akute Rezeptoraktivierung erfolgte mit 10 μmol/l DADLE. Dargestellt ist der Einbau von [³⁵S]GTPγS bezogen auf die basale Aktivität in unbehandelten Membranen naiver Zellen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen dar, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

3.3.1.2 Effizienz der Rezeptor/G-Protein-Interaktion

Die funktionelle Kopplung des μ-Opioidrezeptors wurde anhand von Dosis-Wirkungskurven untersucht. Dies erfolgte sowohl in naiven als auch in chronisch Morphin vorbehandelten Zellen in Ab- oder Anwesenheit der Konstrukte IIC2 und VC1, die für die Gβγ- bzw. Gα_i-Bindung von Bedeutung sind. Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit einer gleich bleibenden Menge an Membranprotein (20 μg) und steigenden Konzentrationen von DADLE (10⁻⁹ bis 10⁻⁵ mol/l) erstellt und die halbmaximal wirksame Konzentration (EC₅₀) durch nicht lineare Regression bestimmt. Werden die Konzentrations-Wirkungskurven von naiven und chronisch Morphin vorbehandelten Kontrollzellen verglichen (Abbildung 19), so sind keine Unterschiede in der Wirkpotenz von DADLE erkennbar (EC₅₀ naiv: 2,52 x 10⁻⁷ mol/l; EC₅₀ vorbehandelt: 1,79 x 10⁻⁷ mol/l). Die Expression der jeweiligen G-Protein-Bindungsstellen für Gβγ (IIC2) bzw. Gα_i (VC1) führen zu einer deutlichen Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven um den Faktor 2,3 (IIC2) bzw.

5,1 (VC1), die einen Hinweis für eine effizientere Rezeptor/G-Protein-Kopplung liefert. Die beiden Konstrukte scheinen somit einen positiven „feedback“ auf den G-Protein-Zyklus auszuüben. Die chronische Morphinbehandlung hebt diesen Effekt wieder vollständig auf.

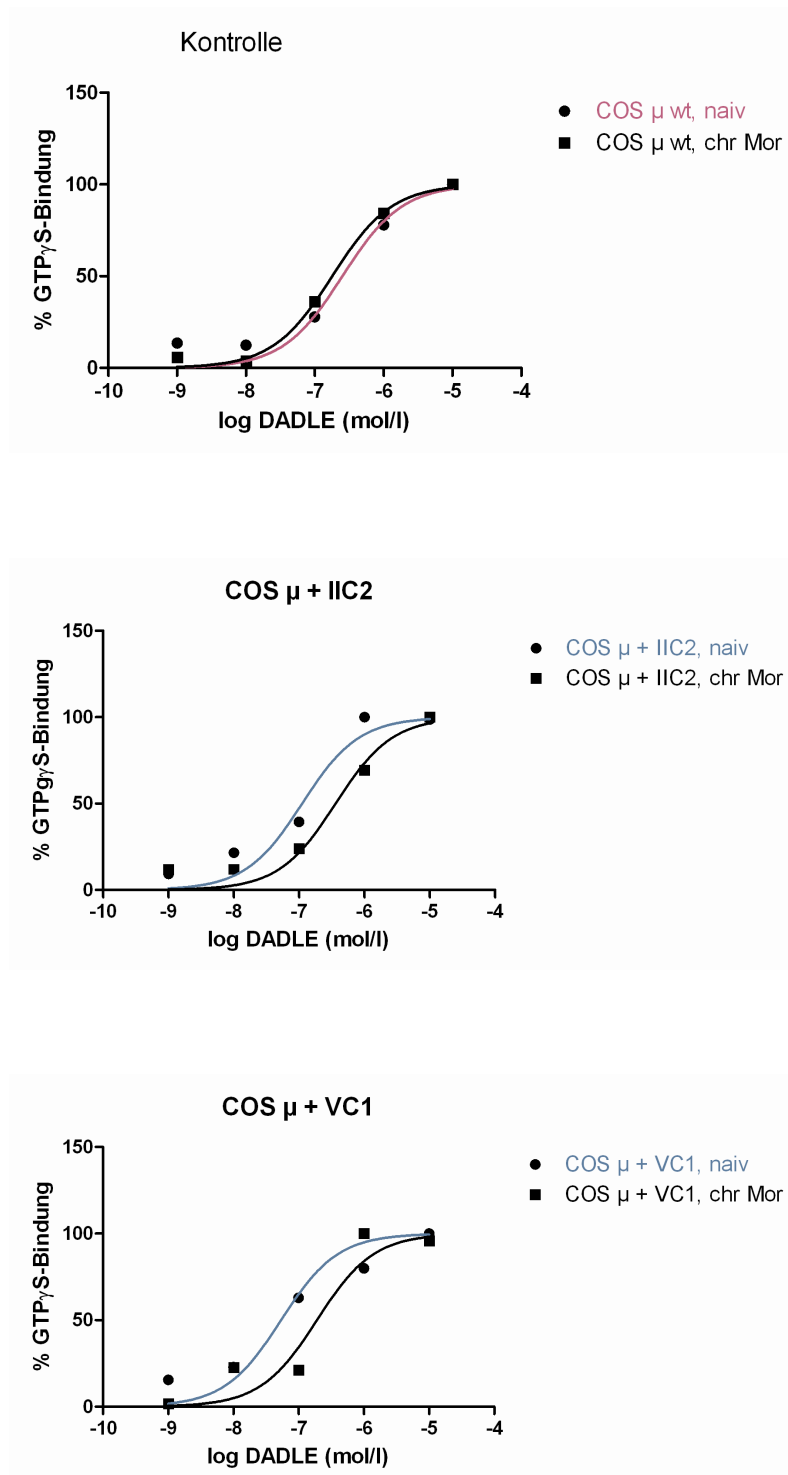
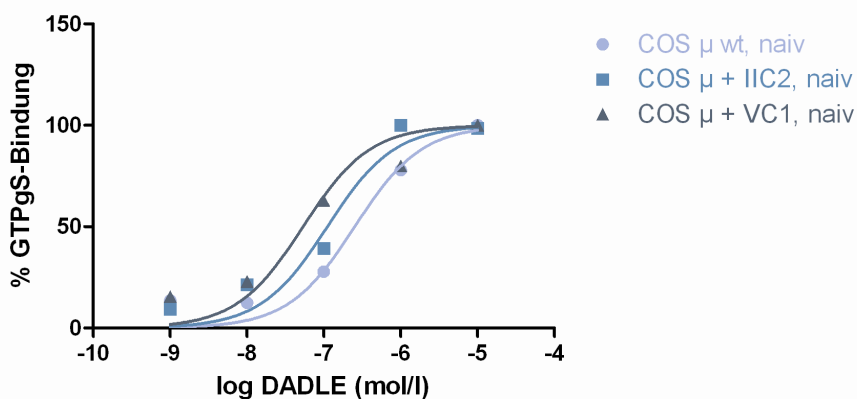


Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit der DADLE-stimulierten GTPγS-Bindung in COSμ-Zellen. Kontrollzellen sowie mit IIC2 und VC1 transfizierte COSμ-Zellen wurden auf 150 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und für einen Tag in An- oder Abwesenheit von Morphin kultiviert. Die Membranen wurden mit steigenden Konzentrationen an DADLE (1 nmol/l bis 10 μmol/l) stimuliert, auf der logarithmischen Abszisse als -9 bis -5 dargestellt. Die Daten sind in Prozent der maximalen GTPγS-Bindung ausgedrückt. Die Meßpunkte stellen Mittelwerte von n = 3 Bestimmungen dar.

In Abbildung 20 sind die Effekte der verschiedenen Adenylatzyklasekonstrukte auf die Rezeptor/G-Protein-Kopplung noch einmal für naive und vorbehandelte Zellen vergleichend dargestellt. Die Kurve der IIC2 exprimierenden Zellen ($EC_{50} = 1,11 \times 10^{-7}$ mol/l) ist in Bezug auf die nicht transfizierten Kontrollzellen nach links verschoben ($EC_{50} = 2,52 \times 10^{-7}$ mol/l). Die Transfektion der Zellen mit VC1 verschiebt diese noch weiter nach links ($EC_{50} = 0,54 \times 10^{-7}$ mol/l). Nach chronischer Morphinexposition werden die Dosis-Wirkungskurven in Anwesenheit der Konstrukte jeweils wieder um den Faktor 4 nach rechts verschoben (EC_{50} für IIC2 = $3,62 \times 10^{-7}$ mol/l; VC1 = $1,91 \times 10^{-7}$ mol/l). Obwohl die chronische Morphinbehandlung in Anwesenheit der IIC2- und VC1-Konstrukte keine Abnahme in der maximalen Aktivierbarkeit der G-Proteine bewirkt, vermitteln diese eine Desensibilisierung der Rezeptor/G-Protein-Interaktion.



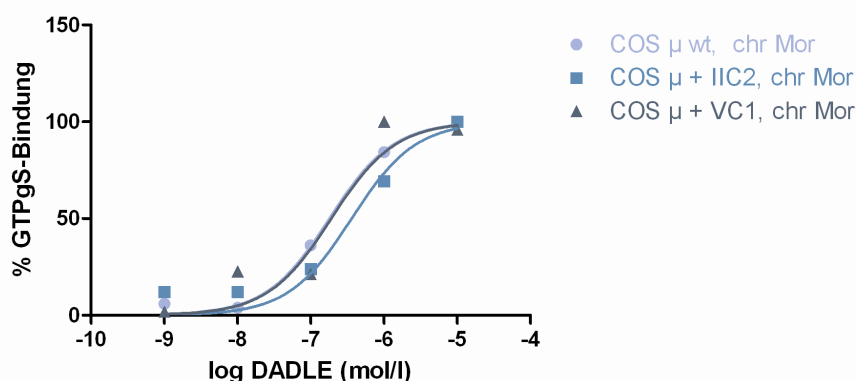


Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit der GTP γ S-Bindung in transfizierten COS μ -Zellen. Die Daten der Abbildung 19 wurden vergleichend dargestellt. Die obere Hälfte zeigt die Effekte der Adenylatzyklasekonstrukte auf die DADLE stimulierte G-Protein-Aktivierung in nicht vorbehandelten Zellen, die untere Hälfte nach chronischer Morphinbehandlung.

3.3.2 ERK1/2-Aktivierung

Um den Einfluss der Adenylatzyklasekonstrukte auf die intrazelluläre Signaltransduktion zu untersuchen, wurde die Opioidrezeptor vermittelte Regulation der MAP-Kinasen als cAMP unabhängiger Effektor untersucht. Die Aktivierung der MAP-Kinasen wurde im Westernblot mittels eines phospho-spezifischen ERK1/2 Antikörpers bestimmt. Ein Beispiel ist in Abbildung 21 dargestellt. In Kontrollzellen führt die kurzzeitige Aktivierung des Opioidrezeptors sowohl mit DADLE als auch mit Morphin zu einer starken Zunahme der MAP-Kinase-Phosphorylierung. Dieser Effekt desensibilisiert nach chronischer Morphinbehandlung. Werden diese Zellen erneut mit DADLE stimuliert, so ist im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen eine deutlich schwächere Aktivierung zu beobachten. Die Ergebnisse von vier Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet und die Rezeptor vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung graphisch dargestellt (Abbildung 22). Bezogen auf den Basalwert stimuliert DADLE und Morphin die MAP-Kinase in Kontrollzellen um das 3,4- bzw. 3,2fache. Nach chronischer Behandlung der Zellen mit Morphin stimuliert





Abb. 21: Repräsentativer MAP-Kinase Westernblot. Der Effekt von DADLE und Morphin auf die MAP-Kinase-Stimulation in COS μ -Zellen wurde entweder in Abwesenheit (wt) oder nach Expression der Adenylatzyklasten II und V sowie der Konstrukte IIC1, IIC2, VC1 und VC2 bestimmt. Die Reihenfolge der aufgetragenen Proben ist in jeder Gruppe wie folgt: unbehandelte Zellen (1), mit DADLE (2) und Morphin (3) akut stimulierte Zellen, chronisch Morphin vorbehandelte Zellen in Anwesenheit von Morphin (4) oder von DADLE (5). Dargestellt ist die charakteristische Doppelbande, die den ERK1/2 MAP-Kinasen (42 bzw. 44 kDa) entspricht.

DADLE nur noch um das 2,2fache. Die Expression der ACII hat keinen Einfluss auf die MAP-Kinase-Regulation in COS μ -Zellen. Dagegen bewirkt die Transfektion der einzelnen zytoplasmatischen Domänen der ACII (IIC1 und IIC2) eine Abschwächung der μ -Opioidrezeptor vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung, sowohl in naiven als auch in vorbehandelten Zellen. Die Expression der ACV übt keinen Einfluss auf die DADLE stimulierte MAP-Kinase-Aktivierung aus, dagegen wird die akute Stimulierbarkeit durch Morphin vermindert. Werden die Zellen mit Morphin vorbehandelt, so steigt dagegen die basale Aktivität an. Dies bedeutet, dass die Desensibilisierung der MAP-Kinase nach längerfristiger Morphinexposition nur unvollständig ausgebildet ist. Es zeigt sich auch darin, dass die akute Stimulierbarkeit der MAP-Kinase durch DADLE in chronisch vorbehandelten, ACV-transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen stark zunimmt. Diese Effekte lassen sich auch mit den isolierten Domänen VC1 und VC2 teilweise nachvollziehen. Bei beiden Konstrukten ist ebenfalls eine deutlich schwächere MAP-

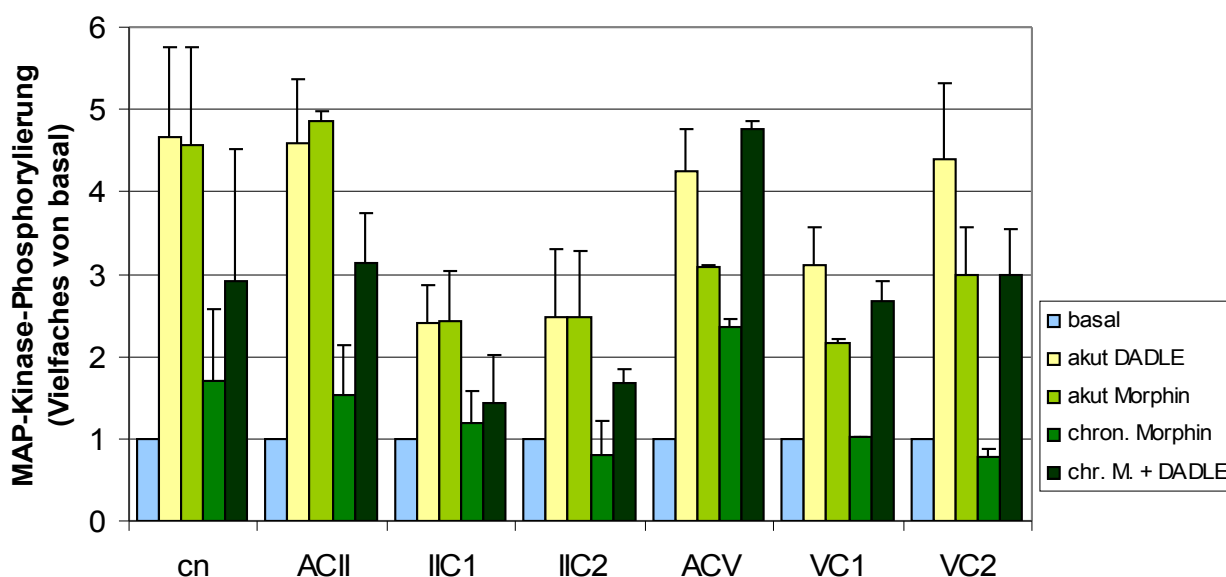


Abb. 22: MAP-Kinase-Phosphorylierung in COS μ -Zellen. Die Zellen wurden nach Transfektion auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Zur Induktion chronischer Opioideffekte wurden die Zellen 24 Stunden mit zugegebenem Morphin (1 μ mol/l) inkubiert. Die Induktion der MAP-Kinase erfolgte durch Behandlung der Zellen mit DADLE (1 μ mol/l) und Morphin (1 μ mol/l). Die Reaktion wurde durch Absaugen des Mediums und Lyse der Zellen mittels Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt. Das Diagramm zeigt die Phosphorylierung nach verschiedener Behandlung im Verhältnis zur Phosphorylierung unbehandelter (basal) Zellen als Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Versuchen.

Kinase-Stimulation nach akuter Aktivierung des μ -Opioidrezeptors mit Morphin zu beobachten, wohingegen keine Zunahme der basalen Aktivität nach chronischer Morphinbehandlung stattfindet. Die maximale Stimulierbarkeit der MAP-Kinase ist in Anwesenheit von VC1 allerdings allgemein niedriger ausgeprägt.

3.3.3 Rezeptorinternalisierung

Der Effekt der Adenylatzyklasekonstrukte auf die Rezeptorinternalisierung wurde sowohl in naiven als auch chronisch mit Morphin behandelten COS μ -Zellen nach einstündiger Behandlung mit Etorphin untersucht. Das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung wurde durch Radioligandenbindung an isolierten Plasmamembranen bestimmt. In Kontrollzellen führt die Zugabe von 100 nmol/l Etorphin zu einer nur schwach ausgeprägten Internalisierung des μ -Opioidrezeptors von etwa 5 %. Nach chronischer Behandlung mit Morphin erhöht sich dagegen die Zahl der Oberflächenrezeptoren um 20 %, ein Effekt, der durch das starke Recycling intrazellulär gespeicherter μ -Opioidrezeptoren erklärt werden kann.

Werden diese Zellen gewaschen und anschließend mit Etorphin behandelt, so ist wiederum eine Internalisierung der Rezeptoren um 6,5 % messbar. Wird die ACII in die Zellen eingebracht, so wird die Etorphin vermittelte Internalisierung des μ -Opioidrezeptors geringfügig verstärkt (13,5 %). Nach chronischer Morphinbehandlung nimmt die Zahl der Oberflächenrezeptoren um 25 % zu. Die Internalisierung der μ -Opioidrezeptoren mit Etorphin beträgt in diesen Zellen 20,7 %. Der chronisch Morphin induzierte Anstieg der Oberflächenrezeptoren (33,9 %) sowie die Internalisierung des μ -Opioidrezeptors in vorbehandelten Zellen werden nach Expression des IIC1-Fragmentes noch verstärkt (38,5 %). Obwohl in Anwesenheit von IIC2 kein Einfluss auf die akute Rezeptor-internalisierung zu beobachten ist, verstärkt die Aktivierung des μ -Opioidrezeptors mit Etorphin den Anstieg der Oberflächenrezeptoren in vorbehandelten Zellen (39,1%). Transfiziert man die Zellen mit ACV, so wird die akute Rezeptorinternalisierung mit Etorphin aufgehoben. Die chronische Morphinbehandlung führt dagegen nach wie vor zu einem Anstieg der Oberflächenrezeptoren, der durch nachfolgende Aktivierung des μ -Opioidrezeptors mit Etorphin wieder rückgängig gemacht wird. Werden die Zellen dagegen mit den Teilfragmenten der Adenylatzyklase V transfiziert, so bedingt die chronische Morphinbehandlung keine Erhöhung der Rezeptorenmenge an der Zelloberfläche. Dagegen wird die Rezeptorinternalisierung durch beide Konstrukte sowohl in

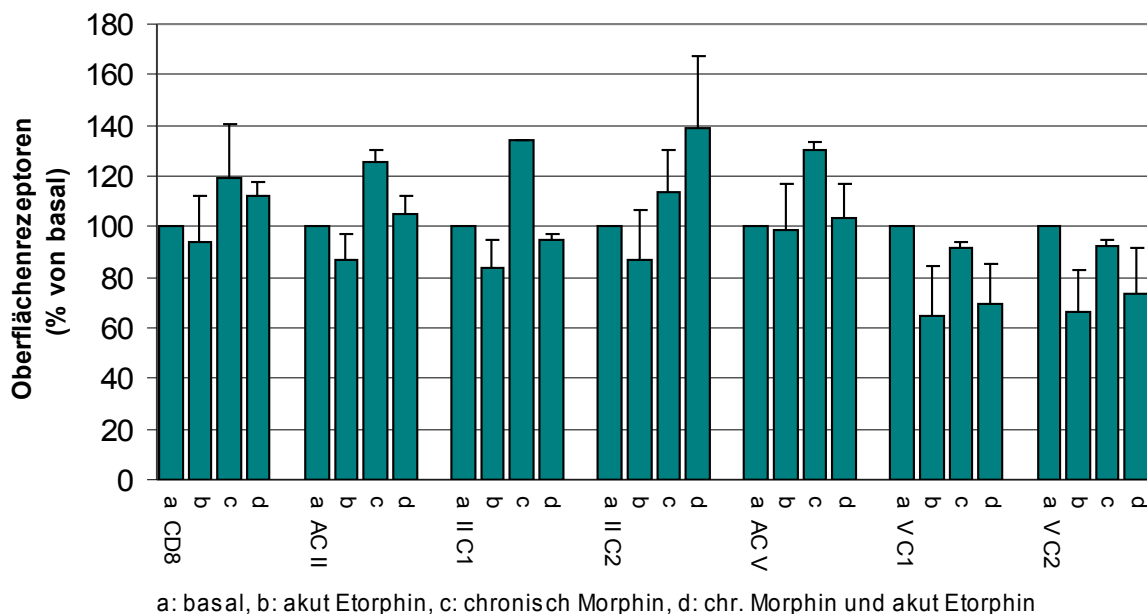


Abb. 23: Regulation der Oberflächenrezeptoren in COS μ -Zellen. COS μ -Zellen wurden mit

den Plasmiden für die entsprechenden Konstrukte transfiziert, auf 66 cm²-Zellkulturplatten ausgesät und zur Induktion chronischer Opioideffekte die Zellen 24 Stunden in Anwesenheit von Morphin (1 µmol/l) inkubiert. Die Internalisierung wurde durch Zugabe von 100 nmol/l Etorphin induziert und durch Radioligandenbindung an Membranpräparationen bestimmt. Die Daten wurden auf die Anzahl der Oberflächenrezeptoren unbehandelter Zellen (basal) normalisiert und stellen die Mittelwerte ± Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

naiven als auch vorbehandelten Zellen verstärkt (VC1: 35,2 vs 24,2 %; VC2: 33,5 vs 20,3 % ohne bzw. mit Vorbehandlung). In Abbildung 23 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Um die Internalisierung unabhängig von den chronisch Morphin induzierten Effekten auf die Anzahl der Oberflächenrezeptoren darzustellen, wurden die Etorphin induzierten Internalisierungsraten zwischen naiven und chronisch Morphin vorbehandelten Zellen in Abbildung 23 vergleichend dargestellt. Dabei wird verdeutlicht, dass die chronische Morphinbehandlung die Rezeptorinternalisierung in Anwesenheit der Adenylatzyklase V sowie des IIC1-Fragments erhöht. Dagegen wird die Internalisierung des µ-Opioidrezeptors in Anwesenheit von IIC2 nicht nur aufgehoben, es kommt sogar zu einer Zunahme der Oberflächenrezeptoren. Die Expression von VC1 und VC2 führt zu einer Abschwächung der Rezeptorinternalisierung nach chronischer Morphinbehandlung.

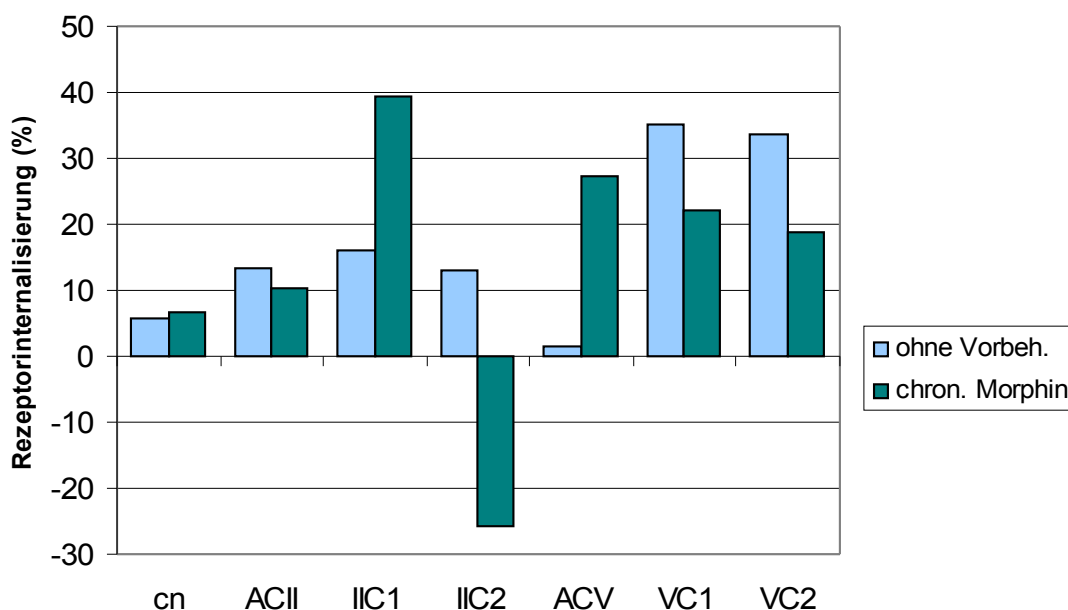


Abb. 24: Etorphin induzierte Regulation von Oberflächenrezeptoren in COS μ -Zellen. Die akute Rezeptorinternalisierung wurde im Verhältnis zu den Ausgangswerten (naiv; chronisch Morphin behandelt) dargestellt. Die Daten stellen die Mittelwerte von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

3.3.4 Umverteilung von GRK2 und β -Arrestin 1

Die Aktivierung des μ -Opioidrezeptors führt zur Translokation von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen aus dem Zytosol an die Zellmembran. Hier vermitteln sie die Phosphorylierung des Rezeptors, der nun zum Substrat für weitere zytosolische Proteine aus der Familie der Arrestine wird. Diese stellen Adapterproteine dar, die den Rezeptor nicht nur abkoppeln, sondern auch der Endozytose zuführen. Die Agonist vermittelte Umverteilung der in COS μ -Zellen vorherrschenden zytosolischen Vertreter der Rezeptorkinasen (GRK2) und Arrestine (β -Arrestin 1) kann daher wesentliche Einblicke in die Regulation der Opioidrezeptorfunktion durch die transfizierten Adenylatzyklasekonstrukte liefern. Hierzu wurden die verschiedenen Konstrukte in COS μ -Zellen exprimiert und die Umverteilung der Proteine durch kurzzeitige Aktivierung der μ -Opioidrezeptoren mit DADLE (7 min; 1 μ M) induziert. Die Zellen wurden anschließend auf Eis verbracht, geerntet und der Gehalt von GRK2 bzw. β -Arrestin 1 in Membranen mittels Westernblot bestimmt. Als Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen die β 1/2-Untereinheit des G-Proteins verwendet, der als Vergleichsstandard diente.

3.3.4.1 GRK2-Translokationen

In Abbildung 25 ist ein repräsentativer Westernblot zur Bestimmung der DADLE stimulierten Umverteilung von GRK2 dargestellt. Die Filme von 3 unabhängigen Versuchen wurden densitometrisch ausgewertet und die relative Änderung der GRK2-Immunreaktivität nach akuter und chronischer Aktivierung des μ -Opioidrezeptors vergleichend dargestellt (Abbildung 26). Bei den mit dem CD8-Membrananker alleine transfizierten Kontrollzellen ist weder nach akuter noch chronischer Opioidbehandlung eine deutliche Änderung des membranassoziierten GRK2 zu beobachten. Werden die Zellen mit ACII transfiziert, führt dies zu einer leichten Zunahme der GRK2 Umverteilung nach chronischer Morphinbehandlung, ein Effekt, der in Anwesenheit der Adenylatzyklase V noch verstärkt wird. Wird in COS μ -Zellen die zytoplasmatische Domäne der Adenylatzyklase II (IIC1) exprimiert, so dissoziiert GRK2 sowohl nach akuter als auch

chronischer Opioidbehandlung von der Membran ab. Im Gegensatz dazu führt die akute und chronische Aktivierung des μ -Opioidrezeptors in Anwesenheit des Konstruktes IIC2 zu einer sehr starken Anreicherung von GRK2 an der Plasmamembran (1,4fach), ein Effekt, der nach akuter DADLE Exposition von chronisch mit Morphin vorbehandelten Zellen noch verstärkt wird (2,2fache Zunahme). Die Expression des VC1-Konstruktes bewirkt ebenfalls eine deutliche Zunahme der Agonist vermittelten GRK2 Umverteilung

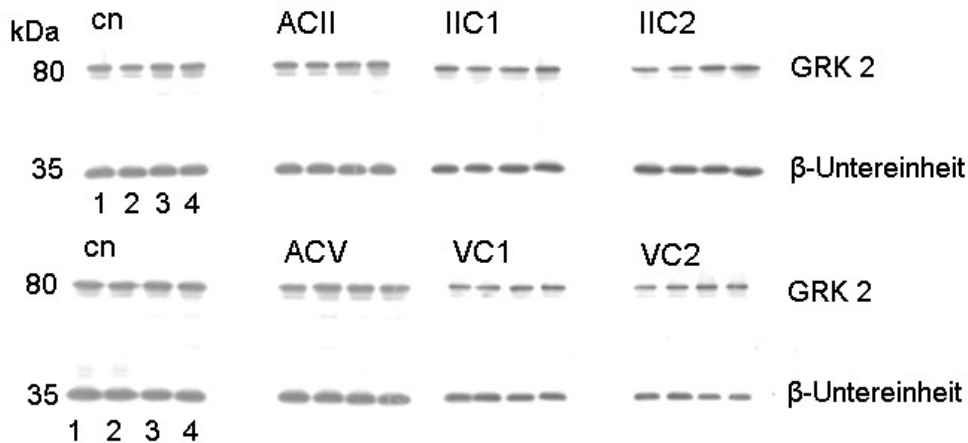


Abb. 25: Repräsentativer GRK2-Westernblot von COS μ -Zellen. In der oberen Hälfte wurden die Zellen entweder mit dem CD8-Membrananker (cn), der ACII bzw. den Konstrukten IIC1 und IIC2 transfiziert, in der unteren Hälfte mit CD8, ACV, VC1 und VC2. Die Zellen einer jeden Vierergruppe wurden wie folgt behandelt: 1) unbehandelt, 2) akute DADLE Stimulation, 3) chronische Morphinbehandlung und 4) akute DADLE Stimulation von chronisch vorbehandelten Zellen. Das relative Molekulargewicht der Banden beträgt 80 (GRK2) bzw. 35 kDa (β -Untereinheit).

nach chronischer Morphinbehandlung, während die Anwesenheit von VC2 sowohl die akute als auch chronisch Opioid induzierte Assoziation von GRK2 an der Zellmembran steigert.

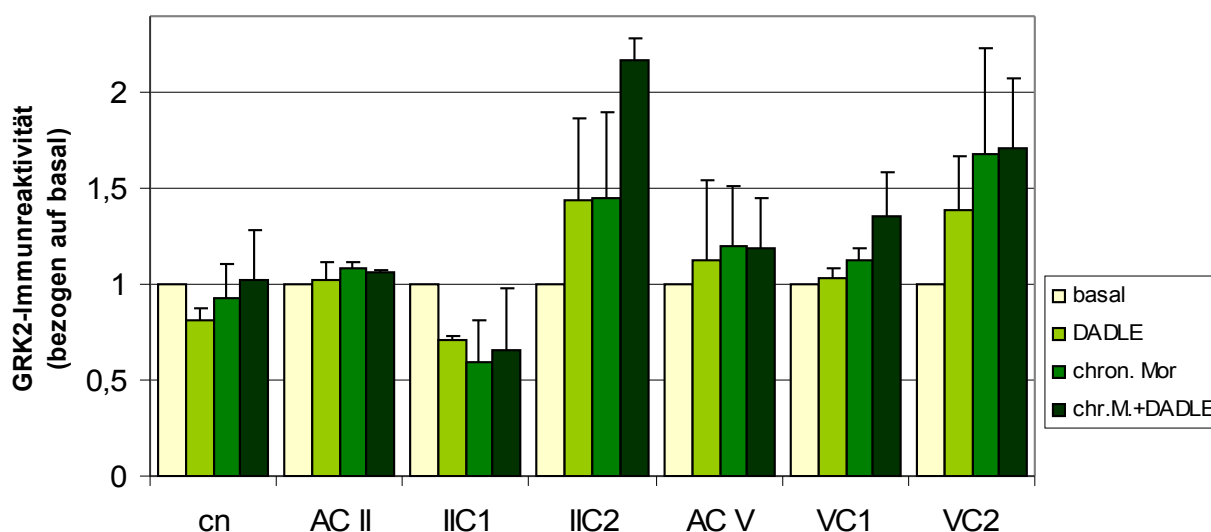


Abb. 26: Agonist vermittelte Translokation von GRK2 in COS μ -Zellen. Die Zellen wurden nach der Transfektion auf 60 cm²-Kulturschalen ausgesät und für 24 Stunden entweder in Ab- oder Anwesenheit von Morphin (1 μ mol/l) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und die μ -Opioidrezeptor vermittelte Umverteilung von GRK2 durch kurzzeitige Inkubation mit DADLE (1 μ mol/l; 7 min) induziert. Chronisch mit Morphin vorbehandelte Zellen wurden in Anwesenheit von Morphin untersucht. Die Daten stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen dar sind auf die basale Immunreaktivität von Kontrollzellen bezogen.

3.3.4.2 β -Arrestin 1-Translokation

Die Translokation von β -Arrestin1 an die Zellmembran ist in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Die akute Aktivierung des μ -Opioidrezeptors führt in Kontrollzellen zu einer Abdissoziation von β -Arrestin 1, während die chronische Vorbehandlung der Zellen mit Morphin zu einer ca. 1,7fachen Zunahme der β -Arrestin 1-Immunreaktivität an der Plasmamembran führt. Die Expression von ACII führt dagegen zu einer deutlichen Umverteilung von β -Arrestin 1 sowohl nach akuter Rezeptoraktivierung (2,7fache Zunahme) als auch nach chronischer Morphinbehandlung (5,8fache Zunahme). Die zytosolische Domäne IIC1 der Adenylatzyklase II scheint bei der Ausbildung dieses Effekts beteiligt zu sein, da dieses ebenfalls eine Steigerung der DADLE stimulierten

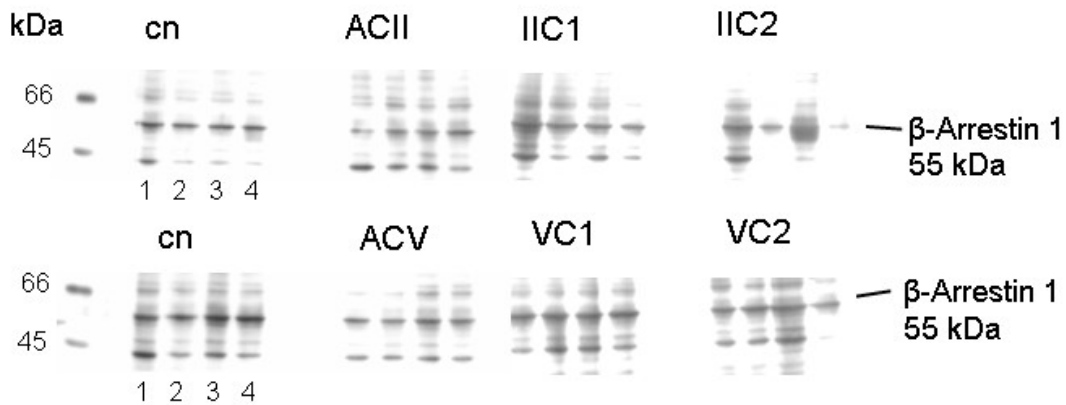


Abb. 27: Repräsentativer β -Arrestin 1 Westernblot von COS μ -Membranen. In der oberen Hälfte waren die Zellen entweder mit dem Membrananker (wt) oder mit Plasmiden für die ACII und die IIC1- bzw. IIC2-Konstrukte transfiziert. Die Zellen der unteren Bildhälfte exprimierten CD8, ACV, VC1 bzw. VC2. Die einzelnen Banden einer jeden Vierergruppe stellen folgende Behandlungen dar: 1) unbehandelte Zellen, 2) akut mit DADLE stimulierte Zellen, 3) chronisch mit Morphin vorbehandelte Zellen und 4) nach Vorbehandlung nochmals mit DADLE stimulierte Zellen. Das relative Molekulargewicht von β -Arrestin 1 liegt bei 55 kDa.

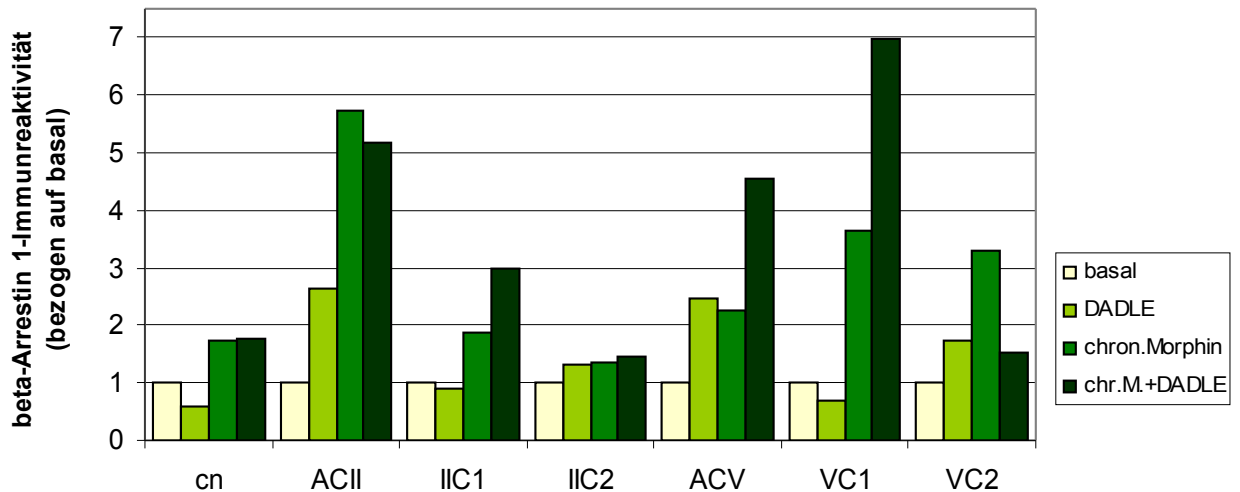


Abb. 28: Agonist induzierte Translokation von β -Arrestin 1 in COS μ -Zellen. Die Zellen wurden nach Transfektion auf 60 cm²-Kulturschalen ausgesät und entweder in Ab- oder Anwesenheit von Morphin (1 μ mol/l) inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde die Umverteilung von β -Arrestin 1 durch akute Aktivierung des μ -Opioidrezeptors mit DADLE (1 μ mol/l; 7 min) induziert. Die Reaktion wurde durch Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS gestoppt. Membranen wurden präpariert und das β -Arrestin 1 mittels Westernblot bestimmt. Die Daten stellen die β -Arrestin 1-Immunreaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

Membranassoziation von β -Arrestin 1 nach chronischer Morphinbehandlung vermittelt (2,9fache Zunahme). Das Konstrukt IIC2 dagegen besitzt keine Auswirkungen auf die β -Arrestin 1-Translokation. Die Expression der Adenylatzyklase V bewirkt eine deutliche Umverteilung von β -Arrestin 1, sowohl nach akuter (2,5fache Zunahme) als auch chronischer Aktivierung der Opioidrezeptoren (2,3fache Zunahme). Die akute Aktivierung von μ -Opioidrezeptoren in chronisch mit Morphin vorbehandelten Zellen führt sogar zu einem 4,6fachen Anstieg der β -Arrestin 1-Immunreaktivität. Werden die Zellen mit den Konstrukten VC1 und VC2 transfiziert, so bedingen beide eine Anreicherung von β -Arrestin 1 an der Plasmamembran nach einer chronischen Morphinbehandlung (3,7 bzw. 3,3fache Zunahme). In diesen vorbehandelten Zellen kann dagegen lediglich die Expression von VC1 die akute Umverteilung von β -Arrestin 1 weiter steigern (6,9fache Zunahme).

4. DISKUSSION

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung cAMP-unabhängiger Wirkungen der Adenylatzyklase auf die Regulation der Opioidrezeptorfunktion. Das cAMP „second messenger“ System ist wesentlich an der Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit nach chronischer Opioidexposition beteiligt, indem es über PKA vermittelte Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen in die Zellfunktion und Genregulation eingreifen kann (Lane-Ladd et al., 1997; Nestler und Aghajanian, 1997; Watts und Neve, 2005). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Adenylatzyklase neben ihrer katalytischen Eigenschaft noch weitere, cAMP-unabhängige Funktionen auf den G-Protein-Zyklus ausüben kann. Diese besteht im Sinne eines positiven „feedback“ auf die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheiten, die zu einer Beschleunigung des G-Protein-Kreislaufs führt (Scholich, 1999; Wittpoth et al., 2000, 2002). Da die nach Aktivierung eines G-Proteins freigesetzten $G\beta\gamma$ -Dimere eigenständige Signalmoleküle darstellen und mit einer Vielzahl an intrazellulären Proteinen mit einer so genannten „pleckstrin“ homologen Domäne interagieren können (Inglese et al., 1995; Scaife und Margolis, 1997), erscheint eine indirekte Regulation der Rezeptorsensitivität als möglich. Aus diesem Grund wurden katalytisch inaktive Fusionsproteine aus den cyto-plasmatischen Domänen der Adenylatzyklasen II und V sowie der transmembranären Domäne des CD8 T-Zell-Rezeptors als Membrananker hergestellt und ihr Einfluss auf die Regulation opioidderger Signalkaskaden charakterisiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die C1-Domäne der Adenylatzyklase V (Bindungsstelle für $G\alpha_i$) sowohl eine „scavenger“ Funktion hinsichtlich der akuten Opioidwirkung auf die Adenylatzyklase als auch eine GAP-Funktion auf den G-Protein-Zyklus aufweist. Diese geht mit einer verminderten Ausbildung von Abhängigkeit einher. Die C2-Domäne der Adenylatzyklase II ($G\beta\gamma$ -Bindungsstelle) dagegen führt zu einer verstärkten Ausbildung von Toleranz nach längerfristiger Morphinbehandlung. Darüber hinaus greifen beide intrazelluläre Domänen der Adenylatzyklase in die akute Regulation der Rezeptorfunktion nach kurzzeitiger Agonistexposition ein.

Die Auswahl der zytoplasmatischen Domänen für die Herstellung der Fusionsproteine orientierte sich an den bekannten Bindungsstellen für die $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an den Adenylatzyklasen II und V (Yan et al., 1996; Scholich et al., 1997;

Sunahara et al., 1997; Dessauer et al., 1998; Wittpoth et al., 1999; Weitmann et al., 2001). Um eine Interaktion der exprimierten Proteine mit endogenen Adenylatzyklasen zu verhindern, wurden die intrazellulären Domänen an die transmembrane Domäne des T-Zell-Rezeptors (CD8) fusioniert (Littman et al., 1985). Die entsprechenden Sequenzen wurden mittels PCR vervielfältigt und über zusätzlich eingebrachte Restriktionsstellen in einen geeigneten Vektor (Plasmid pcDNA3.1(+)) ligiert. Alle DNA Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Restriktionsverdau überprüft. Die Charakterisierung der translatierten Proteine erfolgte biochemisch im Westernblot und pharmakologisch mithilfe einer Reihe funktioneller Analysen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Konstrukte vollständig translatiert und in der Zellmembran verankert werden.

Als Zellmodell für die funktionellen Untersuchungen der Fusionsproteine wurden COS-7 Zellen gewählt, da diese lediglich eine einzige endogene Adenylatzyklase exprimieren (AC IX), welche nicht durch inhibitorische Rezeptoren und G-Proteine reguliert wird (Premont, 1994). Durch Rekonstitution funktionell intakter Opioidrezeptorsysteme kann daher die Bedeutung einzelner Adenylatzyklasen für die Ausbildung akuter und chronischer Opioidwirkungen bestimmt werden (Avidor-Reiss et al., 1996). Da diese Zellen keine endogenen Opioidrezeptoren besitzen, wurde hierfür eine stabile Zelllinie etabliert, die eine konstant hohe Anzahl von μ -Opioidrezeptoren der Ratte exprimiert (COS μ -Zellen). Für die Aussagekraft der Studie war es von Bedeutung, dass die eingebrachten Konstrukte nicht mit der endogenen Adenylatzyklase vom Typ IX interagieren. In der Tat war keines der Fusionsproteine in der Lage, die cAMP Produktion in Forskolin behandelten COS μ -Zellen zu steigern. Somit kann eine Dimerisierung mit den zytoplasmatischen Domänen der endogen exprimierten Adenylatzyklase IX zu einem katalytisch aktiven Komplex ausgeschlossen werden (Weitmann et al., 1999). Nach Kotransfektion komplementärer Domänen der Adenylatzyklase II (IIC1 und IIC2) konnte allerdings eine starke Zunahme der cAMP Produktion beobachtet werden. Obwohl die Koexpression der VC1 und VC2 Konstrukte nur einen geringgradigen Anstieg der Forskolin stimulierten Adenylatzyklaseaktivität induzierte, konnte diese Aktivität in Anwesenheit eines Opioids gehemmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die an den CD8-Membrananker fusionierten transmembranen Domänen der Adenylatzyklase nicht mit den endogenen Effektormolekülen interagieren können (Tang et al., 1991). Dagegen

führt die Koexpression komplementärer zytosolischer Domänen der Fusionsproteine zur Bildung enzymatisch und regulatorisch kompetenter Dimere. Ein ähnlicher Effekt ist nach Expression löslicher intrazellulärer Domänen der Adenylatzyklase beschrieben (Yan et al., 1996; Scholich et al., 1997; Dessauer et al., 1998).

Der Einfluss der Fusionsproteine auf die Regulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren wurde am μ -Opioidrezeptor untersucht, da dieser sowohl für die analgetischen Wirkungen als auch für die Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit nach chronischer Opioidbehandlung von großer klinischer Bedeutung ist (Johnson und Fleming, 1989; Williams et al., 2001). Da COS-7 Zellen durch konstitutive Expression des T-Antigens zur episomalen Replikation von Plasmiden befähigt sind (Gluzman, 1981), ist die Herstellung stabiler Transfektanten in diesem Zellsystem mit Schwierigkeiten verbunden. Bisher konnte eine stabile Expression von Proteinen nur mithilfe adenoviraler Vektoren bewerkstelligt werden (Wong, 1994). Für diese Arbeit wurde die cDNA des μ -Opioidrezeptors in das Plasmid pCEP4 (Invitrogen) subkloniert, das keinen SV40 Promoter besitzt. Nach zwei Klonierungsschritten und mehrmaliger Kontrolle mittels Radioligandenbindung konnte eine stabile Zelllinie mit konstanter Rezeptorexpression erfolgreich etabliert werden (COS μ -Zellen). Zur Kontrolle der funktionellen Integrität des heterolog exprimierten Rezeptors wurden die Bindungsparameter überprüft. Die aus den Sättigungsexperimenten abgeleitete Dissoziationskonstante für Diprenorphin entspricht dabei derjenigen des μ -Opioidrezeptors in anderen Zellsystemen und *in vivo* (Goldstein und Naidu, 1989; Chen et al., 1993; Raynor et al., 1994). Eine Besonderheit der COS μ -Zellen zeigte sich jedoch in Bezug auf die Verteilung der Rezeptoren zwischen Zytosol und Zelloberfläche. Im konfokalen Mikroskop wurde beobachtet, dass ein Großteil der μ -Opioidrezeptoren im Zytosol und nicht in der Plasmamembran zu liegen kommt. Dies ist erstaunlich, da μ -Opioidrezeptoren einem ausgeprägten „Recycling“ unterliegen und daher nur zum geringen Teil internalisiert werden können (Koch et al., 1998). Die beachtliche Fraktion intrazellulär gelegener Rezeptoren kann aber auch die Beobachtung erklären, dass die Zahl der Oberflächenrezeptoren bei COS μ -Zellen nach chronischer Morphinbehandlung stark zunimmt.

Die Fähigkeit der zytosolischen Adenylatzyklasedomänen, in die G-Protein vermittelte

Regulation der Adenylatzyklase einzugreifen, wurde in NG108-15 Hybridzellen getestet. Diese Zellen besitzen endogene δ -Opioidrezeptoren und stellen ein klassisches Zellmodell zur Untersuchung akuter wie chronischer Opioidwirkungen dar (Sharma et al., 1975; Ammer und Schulz, 1995). In diesem Zellmodell konnte die Expression der $G\alpha_i$ -Bindungsstelle der Adenylatzyklase V (VC1) die μ -Opioidrezeptor vermittelte Hemmung der cAMP Produktion deutlich abschwächen. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass dieses Fusionsprotein als „scavenger“ fungieren und die $G\alpha_i$ vermittelte Regulation der endogenen Adenylatzyklasen aufheben kann. Aufgrund der Abschwächung des inhibitorischen Signals sind diese Zellen nach chronischer Morphinbehandlung nur zur Ausbildung schwacher zellulärer Korrelate für Abhängigkeit befähigt. Die C2-Domäne der Adenylatzyklase V (VC2) enthält die Bindungsstelle für $G\alpha_s$, die für die stimulatorische Regulation der enzymatischen Aktivität verantwortlich ist (Sunahara et al. 1997). Die Expression dieses Fusionproteins bewirkt keinen Einfluss auf die akute Hemmung der Adenylatzyklase durch Opioidrezeptoren, mildert allerdings das Ausmaß der „Adenylatzyklase-Supersensitivität“ im Opioidentzug erheblich. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung stimulatorischer Rezeptorsysteme für die Ausbildung von Abhängigkeit und Entzugssymptomen (Nestler und Aghajanian 1997; Ammer und Schulz, 1998). Die Expression der C2-Domäne der Adenylatzyklase II (IIC2), die neben der $G\alpha_s$ -einen Großteil der $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle enthält, besitzt ebenfalls keinen Einfluss auf die akute Hemmung der cAMP Produktion durch Opiode. Sie verhindert allerdings vollständig die Ausbildung von Toleranz nach chronischer Opioidbehandlung. Dies wird einerseits durch die Beobachtung bestätigt, dass die Beeinflussung von $G\beta\gamma$ -Dimeren die Ausbildung von Abhängigkeit, nicht aber von Toleranz unterbindet (Hoffman et al., 1996; Avidor-Reiss et al., 1996). Andererseits zeigt dieser Befund, dass die IIC2-Domäne „scavenger“ Funktion besitzt und in intakte $G\beta\gamma$ -Signalwege eingreifen kann. Die verwendeten Konstrukte stellen daher viel versprechende Werkzeuge dar, G-Protein regulierte Signalkaskaden näher zu charakterisieren.

Mit dem Einfluss der zytosolischen Domänen der Adenylatzyklase auf die μ -Opioidrezeptor vermittelte ERK1/2 Stimulation wurden funktionelle Konsequenzen auf ein weiteres, indirekt durch G-Proteine reguliertes Effektorsystem untersucht (Burt et al., 1996; Liebmann, 2001; Williams et al., 2001). In diesem Testsystem besitzt die Expression der intakten Adenylatzyklase vom Typ II keinen Einfluss auf die Opioid stimulierte MAP-

Kinase Aktivierung. In Anwesenheit der beiden regulatorischen Domänen der Adenylatzyklase II (IIC1; IIC2) wird jedoch die maximale Aktivierbarkeit der MAP-Kinase deutlich herabgesetzt. Sowohl die vollständige Adenylatzyklase II als auch die beiden zytosolischen Domänen besitzen keinen Einfluss auf die ausgeprägte Desensibilisierung der akuten MAP-Kinase Aktivierung nach längerfristiger Morphinbehandlung. Die Expression der Adenylatzyklase vom Typ V dagegen bedingt eine deutliche Abnahme der akuten Stimulierbarkeit der MAP-Kinase durch Morphin, nicht aber durch das hocheffiziente Enkephalinanalog DADLE. Dagegen desensibilisiert das System nach chronischer Morphinbehandlung im Vergleich zu Kontrollzellen nicht vollständig. Dieser Effekt wird durch die beiden isolierten zytosolischen Domänen der Adenylatzyklase V (VC1; VC2) imitiert. Obwohl es sich bei der Regulation der ERK1/2 um keinen klassischen G-Protein kontrollierten Effektor handelt (Liebmann, 2001), deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Interaktion der Fusionsproteine mit $G\alpha_i$ -, $G\alpha_s$ - und $G\beta\gamma$ -vermittelten Signalwegen bei der Regulation dieser MAP-Kinasen hin.

Durch den Nachweis einer funktionellen Interaktion der Fusionsproteine mit G-Protein vermittelten Signalkaskaden war es nun von Interesse, ob diese ebenfalls mit den Mechanismen der Agonist induzierten Rezeptorinternalisierung interferieren. Die schnelle Phosphorylierung und Abkopplung des Rezeptors in Anwesenheit eines Agonisten trägt maßgeblich zur Adaptationsfähigkeit der Zelle gegenüber äußeren Einflüssen bei (Law et al., 2000). Durch eine Konformationsänderung wird der aktivierte Rezeptor zum Substrat für G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen, die aus dem Zytosol an die Plasmamembran translozieren und den Rezeptor phosphorylieren (Kohout und Lefkowitz, 2003; Gaintedinov et al., 2004). In COS μ -Zellen wird dies durch die GRK2 bewerkstelligt, die neben ihrer Kinasedomäne auch noch über eine „pleckstrin“ homologe Domäne und eine $G\beta\gamma$ -Bindungsstelle verfügt (Pitcher et al., 1998). Der phosphorylierte Rezeptor besitzt wiederum hohe Affinität für ein weiteres zytosolisches Protein, β -Arrestin 1, das nachfolgend ebenfalls aus dem Zytosol an die Zellmembran wandert. Eine Besonderheit von COS-7 Zellen ist nun, dass diese limitierende Mengen dieser regulatorischen Proteine enthalten (Menard et al., 1997). Aus diesem Grund ist die Internalisierungsrate des μ -Opioidrezeptors in COS μ -Zellen nur schwach ausgeprägt. Im Vergleich zu Kontrollzellen bewirkt die Expression der C2-Domäne der Adenylatzyklase II (IIC2) eine Verstärkung der

Agonist vermittelten Rezeptorinternalisierung. Werden die Zellen dagegen mit Morphin vorbehandelt, so führt dies zu einer Zunahme der Oberflächenrezeptoren, ein Effekt, der durch akute Stimulation dieser Zellen mit Etorphin noch weiter gesteigert wird. Dieser Befund korreliert mit einer vollständigen Blockade der β -Arrestin 1 Umverteilung. Die Expression der C1-Domäne der Adenylatzyklase V (VC1) verstärkt dagegen die akute Internalisierung des μ -Opioidrezeptors. Sie verhindert jedoch die auch in Kontrollzellen beobachtete Zunahme der Oberflächenrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung vollständig.

Obwohl die einzelnen zytosolischen Domänen der Adenylatzyklasen nicht in die Regulation des intrazellulären cAMP Gehaltes eingreifen, besitzen sie dennoch funktionelle Eigenschaften und greifen im Sinne eines „feedback“ Mechanismus in die Regulation der Zellfunktion ein. Am Modell der COS μ -Zellen führt die Expression der G $\beta\gamma$ -Bindungsstelle der Adenylatzyklase II (IIC2) zu einer Sensibilisierung der Opioidrezeptoren. Diese äußert sich einerseits in einer effizienteren Rezeptor/G-Protein-Kopplung und andererseits in einer Zunahme der Oberflächenrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte eine „scavenger“ Funktion des IIC2 Fusionsproteins sein. So ist durchaus vorstellbar, dass die Verfügbarkeit von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten, die von wesentlicher Bedeutung für den Mechanismus der Rezeptorinternalisierung sind, durch Bindung an IIC2 in ihrer Verfügbarkeit eingeschränkt wird (Chen et al., 1995). G $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind für die Translokation der GRK2 an die Zellmembran unerlässlich (Touhara et al., 1994). Ist kein G $\beta\gamma$ vorhanden, steht auch weniger GRK2 für die initiale Phosphorylierung des Rezeptors zur Verfügung. Eine Abnahme der konstitutiven Rezeptorphosphorylierung und damit Zunahme der Zahl funktionell gekoppelter Rezeptoren wäre die Folge. Darüber hinaus könnte die Blockade der GRK2 und β -Arrestin 1 Umverteilung - in Verbindung mit einer Stimulation des Recyclings von μ -Opioidrezeptoren nach Agonistaktivierung - die weitere Zunahme der Oberflächenrezeptoren nach kurzzeitiger Exposition mit einem Agonisten erklären (Koch et al., 1998). Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass Morphin, ein partieller Agonist am μ -Opioidrezeptor (Raynor et al., 1994; Whistler und von Zastrow, 1998; Whistler et al., 1999), in Anwesenheit des IIC2 Konstruktes zum vollen Agonisten

wird. Die beobachtete Abnahme der DADLE stimulierten GTP γ S Bindung bzw. MAP-Kinase Aktivierung in chronisch Morphin vorbehandelten Zellen legt daher eine Verstärkung der Ausbildung zellulärer Korrelate für Toleranz in Anwesenheit des C2 Fragments der Adenylatzyklase II nahe.

Die cAMP-unabhängigen Wirkungen der G α_i -Bindungsstelle der Adenylatzyklase V (VC1) können ebenfalls teilweise durch eine „scavenger“ Funktion des Konstruktes erklärt werden. Eine solche wurde z.B. bei der Abnahme der μ -Opioidrezeptor vermittelten Hemmung der cAMP Produktion nach Expression des Konstrukts in NG108-15 Hybridzellen offensichtlich. Die funktionellen Eigenschaften des VC1 Konstruktes schließen aber auch eine RGS-Aktivität im Sinne eines „feedback“ auf die G-Protein-Aktivität ein. Eine solche GAP-Funktion für die C1-Domäne der Adenylatzyklase V wurde bereits beschrieben (Wittpoth et al., 2000). Durch die Beschleunigung des G-Protein-Zyklus kommt es dabei zu einer vermehrten Bereitstellung kopplungsfähiger heterotrimerer G-Proteine (Hunt et al., 1996). Im Gegensatz zum Verhalten der Zellen in Anwesenheit des IIC2 Fragmentes ist diese Funktion allerdings bereits in naiven Zellen zu beobachten und kann die Sensibilisierung der μ -Opioidrezeptoren erklären. Andererseits beschleunigt die GAP-Funktion die Terminierung Rezeptor vermittelter Signalkaskaden (Hollinger und Hepler, 2002; Clark und Traynor, 2004). Diese ist besonders bei der akuten Stimulation der MAP-Kinase zu beobachten, die in Anwesenheit des VC1 Fragments deutlich niedriger ausfällt. Unsere Ergebnisse weisen darüber hinaus der GAP-Funktion bei der Ausbildung chronischer Opioidwirkungen eine besondere Bedeutung zu. So unterbindet die Expression der C1-Domäne der Adenylatzyklase V die Zunahme der basalen Rezeptor/G-Protein-Kopplung, der MAP-Kinase Aktivität sowie die Hochregulation von μ -Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung. Die Rezeptorfunktion bleibt dabei größtenteils erhalten, da ihre nachfolgende Aktivierung mit Etorphin in einer sehr starken Internalisierung resultiert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die C1-Domäne der Adenylatzyklase V aufgrund ihrer GAP-Funktion die Weiterleitung des chronischen Morphinsignals abschwächt und dadurch die Ausbildung zellulärer Korrelate für Abhängigkeit unterbindet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die zytoplasmatischen Domänen der Adenylatzyklase eigenständige, cAMP-unabhängige Wirkungen auf die transmembrane Signalvermittlung aufweisen. Die hergestellten Fusionsproteine werden durch die transmembrane Domäne des CD8 T-Zell-Rezeptors in die Plasmamembran eingebaut und können so direkt mit benachbarten Signalmolekülen interagieren. Aufgrund ihrer „scavenger“ Funktion erweist sich die IIC2-Domäne als ideales Werkzeug zur Charakterisierung G $\beta\gamma$ vermittelter Signalmechanismen. Die VC1-Domäne kann aufgrund ihrer GAP-Funktion dagegen zur weiteren Charakterisierung G α_i vermittelter Signalkaskaden eingesetzt werden. Durch die Verfügbarkeit dieser Werkzeuge können künftig wertvolle Einblicke in zellulären Mechanismen von Toleranz und Abhängigkeit nach chronischer Opioidbehandlung gewonnen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden cAMP-unabhängige Wirkungen von Adenylatzyklasten auf die Regulation von μ -Opioidrezeptoren nach akuter und chronischer Opioidbehandlung untersucht. Hierfür wurden Fusionsproteine, bestehend aus dem transmembranen Teil des CD8 T-Zell-Rezeptors als Membrananker und den zytosolischen C1- und C2-Domänen der Adenylatzyklasten vom Typ II und V, hergestellt. Die Konstrukte wurden wie folgt bezeichnet: IIC1 und IIC2 für die erste bzw. zweite zytosolische Domäne der Adenylatzyklastase II; VC1 und VC2 für die entsprechenden Domänen der Adenylatzyklastase V. Die Generierung der hierfür kodierenden Expressionsvektoren erfolgte mittels Standard-PCR-Methoden. Die funktionelle Integrität der Konstrukte wurde mittels Westernblot nach Expression in COS-7 Zellen überprüft.

Der Einfluss der Konstrukte auf die Rezeptorregulation wurde an COS-7 Zellen untersucht, die lediglich eine nicht durch inhibitorische Rezeptoren regulierbare Adenylatzyklastase (Typ IX) enthalten. Diese wurden stabil mit der cDNA des μ -Opioidrezeptors der Ratte transfiziert. Der verwendete Zellklon (COS μ) wies eine konstant hohe Dichte funktionell gekoppelter μ -Opioidrezeptoren auf (1.200 fmol Rezeptoren/mg Membranprotein).

Die Fusionsproteine wiesen keine eigenständige katalytische Aktivität auf, da sie nach Expression in COS μ -Zellen die Forskolin stimulierte cAMP Produktion nicht beeinflussten. Sie waren jedoch in der Lage, in von Opioidrezeptoren regulierte Signalmechanismen einzugreifen. Das IIC2 Konstrukt, welches eine Bindungsstelle für G $\beta\gamma$ -Untereinheiten besitzt, führte zu einer Sensibilisierung von Opioidrezeptoren und einer verstärkten Toleranzentwicklung nach chronischer Morphinbehandlung. Dies äußerte sich in einer Abnahme der Rezeptor vermittelten MAP-Kinase Aktivierung und einer starken Zunahme von Oberflächenrezeptoren nach erneuter Agonistexposition. Diese Ergebnisse lassen sich mit einer eingeschränkten Verfügbarkeit von GRK2 aufgrund der „scavenger“ Funktion des Konstruktes für G $\beta\gamma$ -Untereinheiten erklären. Im Gegensatz dazu verhinderte das VC1 Konstrukt, welches eine Bindungsstelle für G α_i -Untereinheiten besitzt, die Ausbildung zellulärer Korrelate für Abhängigkeit. Es unterband die chronisch Morphin vermittelte Erhöhung der basalen GTP γ S-Bindung, der MAP-Kinase Stimulation und der Zunahme von Oberflächenrezeptoren. Diese Beobachtungen lassen sich mit einer Beschleunigung

des G-Protein-Zyklus durch die GAP Funktion der VC1-Domäne erklären.

6. SUMMARY

cAMP-Independent Regulation of Opioid Receptor Function by Adenylyl Cyclases

The present thesis investigates into cAMP-independent effects of adenylyl cyclases (AC) on opioid receptor function after acute and chronic opioid treatment. For this, fusion proteins composed of the transmembrane part of the CD8 t cell receptor as a membrane anchor and the cytosolic C1 and C2 domains of type II and V adenylyl cyclase were generated. The constructs were denoted as follows: IIC1 and IIC2 for the first and second cytosolic domains of AC II and VC1 and VC2 for the corresponding intracellular domains of ACV. Constructs and expression vectors were generated using standard PCR methods. The functional integrity of the constructs was further verified by Western blotting after expression in COS-7 cells.

Interference of the constructs with receptor regulation was examined by use of COS-7 cells which solely contain an AC isoform that is not subjected to regulation by inhibitory receptors (ACIX). COS-7 cells were stably transfected with the rat μ -opioid receptor cDNA. The cell clone selected for further studies (COS μ) carried high levels of functionally coupled μ -opioid receptors.

None of the fusion proteins showed intrinsic catalytic AC activity, as they failed to enhance forskolin stimulated cAMP production after expression in COS μ cells. However, they proved to interfere with opioid receptor signaling. Expression of construct IIC2, containing a G $\beta\gamma$ binding site, resulted in sensitization of opioid receptor function and aided the development of tolerance after chronic morphine treatment. This effect was characterized by a decrease in receptor mediated MAP kinase activation and a strong increase in the fraction of cell surface receptors after subsequent agonist treatment. These results may be explained by the decreased availability of GRK2 due to the G $\beta\gamma$ scavenging properties of the construct. In contrast, the G α_i binding site containing construct VC1 impaired the development of cellular correlates of dependence. This fusion protein prevented chronic morphine induced up-regulation of basal GTP γ S binding and MAP kinase activity as well as the gain in cell surface receptors. These data suggest that the C1 domain of ACV attenuates opioid receptor associated G protein signaling by its intrinsic GAP function.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ammer H, Christ TE. (2002)

Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity.

J Neurochem 83, 818-827

Ammer H, Schulz R. (1993)

Alterations in the expression of G proteins and regulation of adenylyl cyclase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells chronically exposed to low-efficacy mu-opioids.

Biochem J 295, 263-271

Ammer H, Schulz R. (1995)

Chronic activation of inhibitory δ -opioid receptors cross-regulates the stimulatory adenylyl cyclase-coupled prostaglandin E_1 receptor system in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells.

J Neurochem 64, 2449-2457

Ammer H, Schulz R. (1996)

Morphine dependence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with adaptive changes in both the quantity and functional interaction of the PGE₁ receptor and stimulatory G proteins.

Brain Res 707, 235-244

Ammer H, Schulz R. (1998)

Adenylyl Cyclase Supersensitivity in opioid-withdrawn NG 108-15 hybrid cells requires G_s but is not mediated by the G α subunit.

J Pharmacol Exp Ther 286, 855-862

Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lameh J, Sadee W. (1995)

Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged μ -opioid receptor expressed in HEK 293 cells.

J Neurochem 65, 1636-1645

Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, Pfeuffer T, Vogel Z. (1996)

Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation.

J Biol Chem 271, 21309-21315

Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, Bayewitch M, Vogel Z. (1997)

Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific.

J Biol Chem 272, 5040-5047

Beazely MA, Watts VJ. (2006)

Regulatory properties of adenylyl cyclases type 5 and 6: A progress report.

Eur J Pharm 535, 1-12

Berridge MJ. (1993)

Inositol triphosphate and calcium signalling.

Nature 361, 315-325

- Birnboim HC, Doly J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Research 7, 1513-1523
- Brooker G, Harper JF, Terasaki WL, Moylan RD. (1979)
Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP.
Adv Cyclic Nucl Res 10, 1-33
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. (1999)
Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals.
Proc Natl Acad Sci USA 96, 79-84
- Burt AR, Carr C, Mullianey I, Anderson NG, Milligan G. (1996)
Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse δ opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation.
J Biochem 320, 227-235
- Chakrabarti S, Oppermann M, Gintzler AG. (1999)
Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling.
Eur J Pharm 364, 121-123
- Chakrabarti S, Wang L, Tang W-J, Gintzler AR. (1998)
Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signalling during tolerance/dependence.
Mol Pharmacol 54, 949-953
- Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH. (1995)
A region on adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein $\beta\gamma$ subunits.
Science 268, 1166-1169
- Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G, Iyengar R. (1997)
Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in G α stimulation.
Proc Natl Acad Sci USA 94, 14100-14104
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. (1993)
Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain.
Mol Pharmacol 44, 8-12
- Clark MJ, Traynor JR. (2004)
Endogenous regulator of G protein signaling proteins reduce μ -opioid receptor desensitization and down-regulation and adenylyl cyclase tolerance in C6 cells.
J Pharmacol Exp Ther 312, 809-815

Cobb MH, Goldsmith EJ. (1995)
How MAP kinases are regulated.
J Biol Chem 270, 14843-14846

Collier C. (1984)
Epinephrine and epidural narcotics.
Anesthesiology 60, 168-169

Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. (1994)
Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits.
Nature 369, 418-420

Dessauer C, Tesmer JG, Sprang SR, Gilman AR. (1998)
Identification of a G i α binding site on Adenylyl Cyclase V.
J Biol Chem 273, 25831-25839

Eisinger DA, Ammer H, Schulz R. (2002)
Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization.
J Neurosci 22, 10192-10200

Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards Rh. (1992)
Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.
Science 258, 1952-1955

Ferguson SSG, Barak LS, Zhang J, Caron MG. (1996)
Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G-Protein-coupled receptor internalization.
Science 271, 363-366

Ferguson SSG, Zhang J, Barak LS, Caron MG. (1998)
Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization.
Life Sci 62, 1561-1565

Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Guron MG. (2004)
Desensitization of G-protein-coupled receptors and neuronal functions.
Ann Rev Neurosc 27, 107-114

Gao B, Gilman AG. (1991)
Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase.
Proc Natl Acad Sci USA 88, 10178-10182

Gilman AG. (1987)
G-proteins: transducers of receptor-generated signals.
Ann Rev Biochem 56, 615-649

Gintzler AR, Chakrabarti S. (2006)
Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; Altered functionality and associations of signaling molecules.
Life Sci 79(8), 717-722

- Gluzman Yakov. (1981)
SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell 23, 175-182
- Goldstein A, Naidu A. (1989)
Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures.
Mol Pharmacol 36, 265-272
- Goodman OB, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996)
beta-Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta-Adrenergic Receptor.
Nature 383, 447-450
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. (1996)
Diversity and Selectivity of Receptor - G protein interaction.
Ann Rev Pharm Tox 36, 429-459
- Hanoune J, Defer N. (2001)
Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 145-174
- Harrison C, Traynor JR. (2003)
The (35S)GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology.
Life Sci 74, 489-508
- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. (1998)
Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopeptides.
Peptides 19, 1603-1630
- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990)
Turning off the signal: desensitization of β-adrenergic receptor function.
FASEB 4, 2881-2889
- Hepler JR. (1999)
Emerging roles for RGS proteins in cell signaling.
Trends Pharmacol Sci 20, 376-382
- Hollinger S, Hepler JR. (2002)
Cellular regulation of RGS proteins: Modulators and integrators of G protein signaling.
Pharmacol Rev 45, 527-559
- Ho MKC, Wong YH. (2001)
G_z signaling: emerging divergence from G_i signaling.
Oncogene 20, 1615-1625
- Ho MKC, Yung LY, Chan JSC, Chan JHP, Wong CSS, Wong YH. (2001)
Gα₁₄ links a variety of G_i- and G_s-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C.
Br J Pharmacol 132, 1431-1440

Hughes J, Smith T, Kosterlitz H, Forthergill L, Morgan B, Morris H. (1975)
Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.

Nature 258, 577-579

Hunt TW, Fields TA, Casey PJ, Peralta EG. (1996)
RGS10 is a selective activator of G α_i GTPase activity.

Nature 383, 175-178

Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ. (1995)
G $\beta\gamma$ interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways.

Trends Biochem Sci 4, 151-156

Insel PA, Ostrom RS. (2003)

Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and g protein signaling.

Cell Mol Neurobiol 23, 305-314

Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. (1995)

Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A.

J Biol Chem 270, 12481-12484

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. (2002)

Immunologie.

Spektrum, Akademischer Verlag, 5. Auflage, ISBN 3-8274-1079

Johnson RA, Solomon Y. (1991)

Assay of adenylyl cyclase catalytic activity.

Methods Enzymol 195, 3-21

Johnson SM, Fleming WW. (1989)

Mechanisms of cellular adaptive sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence.

Pharmacol Reviews 41, 435-488

Kawabe J, Iwami G, Ebina T, Ohno S, Katada T, Veda Y, Homcy CJ, Ishikawa Y. (1994)

Differential activation of adenylyl cyclases by protein kinase C isoenzymes.

J Biol Chem 269, 16554-16558

Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M. (1996)

Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization.

J Biol Chem 271, 19021-19024

Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, Höllt V. (1998)

Carboxyl-terminal splicing of the rat μ -opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization.

J Biol Chem 273, 13652-13657

- Kohout TA, Lefkowitz RJ. (2003)
Regulation of GRK and arrestins during receptor desensitization.
Mol Pharmacol 63, 9-18
- Koob GF, Nestler EJ. (1997)
The neurobiology of drug addiction.
J Neuropsychiatry Clin Neurosci 9, 482-497
- Kramer HK, Andria ML, Kushner SA, Esposito DH, Hiller JM, Simon EJ. (2000)
Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation.
Brain Res Mol Brain Res
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang W-J, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG. (1989)
Adenylyl Cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure.
Science 244, 1558-1564
- Laemmli UK. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
- Lai HL, Yang TH, Messing RO, Ching YH, Lin SC, Chern Y. (1997)
Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cALP response.
J Biol Chem 272, 4970-4977
- Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ. (1997)
CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioural evidence for a role in opiate dependence.
J Neuroscience 17, 7890-7901
- Laugwitz K-L, Offermanns St, Spicher K, Schultz G. (1993)
 μ and δ opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells.
Neuron 10, 233-242
- Law P-Y, Hom DS, Loh HH. (1983)
Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaption processes.
Mol Pharmacol 24, 413-424
- Law P-Y, Wong YH, Loh HH. (2000)
Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling - Review.
Ann Rev Pharm Tox 40, 389-430
-

- Lee JWM, Joshi S, Chan JSC, Wong YH. (1998)
Differential coupling of μ -, δ - and κ -opioid receptors to $G\alpha_{16}$ -mediated stimulation of phospholipase C.
J Neurochem 70, 2203-2211
- Liebmann C. (2001)
Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity.
Cell Signal 13, 777-334
- Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu-Chen LY. (1999)
U 50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation.
J Biol Chem 274, 12087-12094
- Lin F-T, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1997)
Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin 1.
J Biol Chem 272, 31051-31057
- Lin T-H, Lai H-Z, Kao Y-Y, Sun C-N, Hwang M-J, Chern Y. (2002)
Protein Kinase C inhibits adenylyl cyclase VI by phosphorylation of the regulatory N domain and two catalytic C1 and C2 domains.
J Biol Chem 277, 15721-15728
- Littman DR, Thomas Y, Maddon P, Chess L, Axel R. (1985)
The isolation and sequence of the gene encoding CD8: A molecule defining functional classes of T lymphocytes.
Cell 40, 237-246
- Lustig KD, Conklin BR, Herzmark P, Taussig R, Bourne HR. (1993)
Type II adenylyl cyclase integrates coincident signals from Gs, Gi and Gq.
J Biol Chem. 268(19), 13900-13905
- MacEwan DJ, Milligan G. (1996)
Inverse agonist-induced up-regulation of the human beta2-adrenoceptor in transfected neuroblastoma X glioma hybrid cells.
Mol Pharmacol 50, 1479-1486
- Menard L, Ferguson SS, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. (1997)
Synergistic regulation of β 2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of β -adrenergic receptor kinase and β -arrestin determine kinetics of internalization.
Mol Pharmacol 515, 800-808
- Milligan G, Gierschick P, Spiegel AM, Klee WA. (1986)
The GTP-binding regulatory proteins of neuroblastoma x glioma, NG108-15, and glioma, C6, cells. Immunochemical evidence of a PTX substrate that is neither Ni nor No.
FEBS Lett 195, 225-230
-

- Miyamae T, Fukushima N, Misu Y, Ueda H. (1993)
 δ opioid receptor mediates phospholipase C activation via G_i in *Xenopus* oocytes.
FEBS 333, 311-314
- Neer EJ. (1994)
G proteins: critical control points for transmembrane signals.
Protein Science 3, 3-14
- Nestler EJ, Aghajanian GK. (1997)
Molecular and cellular basis of addiction.
Science 278, 58-63
- Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Bayewitch M, Heldmann E, Vogel Z. (1998)
Regulation of adenylyl cyclase isozymes on acute and chronic activation of inhibitory receptors.
Mol Pharmacol 54, 419-426
- Pak Y, O'Dowd BF, George SR. (1997)
Agonist-induced desensitization of the μ -opioid receptor is determined by threonine 394 preceded by acid amino acids in the COOH-terminal tail.
J Biol Chem 272, 24961-24965
- Pasternak G, Simantov R, Snyder S. (1976)
Characterization of an endogenous morphine-like factor (enkephalin) in mammalian brain.
Mol Pharmacol 54, 504-513
- Pawson T. (1994)
Signal transduction: look at tyrosine kinase.
Nature 372, 726-727
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002)
Seven-transmembrane receptors.
Nature 3, 639-650
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1998)
G protein-coupled receptor kinases.
Annu Rev Biochem 67, 653-692
- Pitcher JA, Paye ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ. (1995)
The G protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity.
Proc Natl Acad Sci USA 92, 8343-8347
- Premont RT. (1994)
Identification of adenylyl cyclases by amplification using degenerate primers.
Methods Enzymol 238, 116-127
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. (1994)
Pharmacological Characterization of the cloned κ -, δ - and μ -opioid receptors.
Mol Pharm 45, 330-334
-

Reisine T, Bell GI. (1993)
Molecular biology of opioid receptors.
Trends Neurosci 16, 506-510

Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (2000)
Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB1 cannabinoid receptor.
Mol Pharmacol 57, 746-752

Scaife RM, Margolis RL. (1997)
The role of the PH domain and SH3 binding domains in dynamin function.
Cell Signal 9, 395-401

Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Händel M, Höllt V. (2000)
Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the μ -opioid receptor in HEK 293 cells.
J Neurochem 74, 414-422

Scholich K, Barbier AJ, Mullenix JB, Patel TB. (1997)
Characterization of soluble forms of nonchimeric adenylyl cyclase V.
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 2915-2920

Scholich K, Mullenix J, Wittpoth C, Poppleton HM, Pierre SC, Lindorfer MA, Garrison JC, Patel TB (1999)
Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase.
Science 238, 1328-1331

Seger R, Krebs EG. (1995)
The MAPK signaling cascade.
FASEB J 9, 726-735

Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. (1975)
Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance.
Proc Natl Acad Sci U S A 72, 3092-3096

Standifer KM, Pasternak GW. (1997)
G proteins and opioid receptor-mediated signalling.
Cell Signal 9, 237-248

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. (1996)
Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases.
Ann Rev Pharm Tox 36, 461-480
Sunahara RK, Dessauer CW, Whisnant RE, Kleuss C, Gilman AG. (1997)
Interaction of $G\alpha_s$ with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase.
J Biol Chem 272, 22265-22271

Sunahara RK, Taussig R. (2002)
Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling.
Mol Intervent 2(3), 168-184

- Szerkeres PG, Koenig JA, Edwardson JM. (1998)
The relationship between agonist intrinsic activity and the rate of endocytosis of muscarinic receptors in a human neuroblastoma cell line.
Mol Pharmacol 53, 759-765
- Tan CM, Kelvin DJ, Litchfield DW, Ferguson SSG, Feldman RD. (2001)
Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase.
Biochemistry 40, 1702-1709
- Taussig R, Gilman AG. (1995)
Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.
J Biol Chem 268, 9-12
- Taussig R, Quarmby LM, Gilman AG. (1993a)
Regulation of purified type I and type II adenylyl cyclases by G protein $\beta\gamma$ subunits.
J Biol Chem 268, 9-12
- Taussig R, Tang W-J, Hepler JR, Gilman AG. (1993b)
Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases.
J Biol Chem 269, 6093-6100
- Taylor DA, Fleming WW. (2001)
Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids.
J Pharmacol Exp Ther 297, 11-18
- Tesmer JJG, Sprang SR. (1998)
The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase.
Curr Opin Struct Biol 8, 713-719
- Tesmer JJG, Sunahara RG, Gilman AG, Sprang SR. (1997)
Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G s α -GTP γ S.
Science 278, 1907-1916
- Thomas JM, Hoffmann BB. (1996)
Isoform-specific sensitization of adenylyl cyclase activity by prior activation of inhibitory receptors: role of $\beta\gamma$ subunits in transducing enhanced activity of the type VI isoform.
Mol Pharmacol 49, 907-914
- Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ. (1994)
Binding of G protein $\beta\gamma$ subunits to pleckstrin homology domains.
J Biol Chem 269, 10271-10220
- Tsu RC, Chan JSC, Wong YH. (1995)
Regulation of multiple effectors by the cloned δ -opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase.
J Neurochem 64, 2700-2707

Ueda H, Miyamae T, Fukushima N, Takeshima H, Fukuda K, Sasaki Y, Misu Y. (1995)
Opioid μ - and κ -receptor mediate phospholipase C activation through Gi1 in *Xenopus* oocytes.

Mol Brain Res 32, 166-170

Vachon L, Costa T, Herz A. (1987)

Opioid receptor desensitization in NG108-15 cells.

Biochem Pharmacol 36, 2889-2897

von Zastrow M. (2004)

A cell biologists's perspective on physiological adaption to opiate drugs.

Neuropharmacology 47 Suppl. 1, 286-292

von Zastrow M, Svingos A, Haberstock-Debic H, Evans C. (2003).

Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaption to opiate drugs.

Curr Opin Neurobiol 13, 348-353

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. (2004)

Opioid Receptors.

Annu Rev Biochem 73, 953-990

Watts VJ, Neve KA. (2005)

Sensitization of adenylyl cyclase by G α i/o-coupled receptors . Review.

Pharmacol Ther 106, 405-421

Weitmann S, Würsig N, Navarro JM, Kleuss C. (1999)

A functional chimera of mammalian adenylyl and guanylyl cyclases.

Biochemistry 38, 3409-3413

Weitmann S, Schultz G, Kleuss C. (2001)

Adenylyl cyclase type II domains involved in G $\beta\gamma$ stimulation.

Biochemistry 40, 10853-10858

Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, von Zastrow M. (2002)

Modulation of postendocytic sorting of G-protein coupled receptors.

Science 297, 615-620

Whistler JL, Chuang H, Chu P, Jan LY, Zastrow M von. (1999)

Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: Implications for the biology of opiate tolerance and addiction.

Neuron 23(4), 737-746

Whistler JL, von Zastrow M. (1998)

Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-Arrestin.

Proc Natl Acad Sci U S A 95, 9914-9919

- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. (2001)
Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence.
Physiol Rev 81, 299-331
- Wittpoth C, Scholich K, Bilyeu JD, Patel TB. (2000)
Adenylyl cyclase regulates signal onset via the inhibitory GTP binding protein Gi.
J Biol Chem 275, 25915-25919
- Wittpoth C, Scholich K, Yigzaw Y, Stringfield TM, Patel TB. (1999)
Regions on adenylyl cyclase that are necessary for inhibition of activity by betagamma and Gi alpha subunits of heterotrimeric G proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A 96, 9551-9556
- Wong YH. (1994)
G_i assays in transfected cells.
Meth Enzymol 238, 81-94
- Yan S-Z, Hahn D, Huang Z-H, Tang WJ. (1996)
Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs α - and Forskolin-activated enzyme in vitro.
J Biol Chem 271, 10941-10945
- Yan S-Z, Huang Z-H, Shaw RS, Tang W-J. (1997)
The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase.
J Biol Chem 272, 12342-12349
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. (1993)
Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain.
Proc Natl Acad Sci USA 90, 6736-6740
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. (1999)
Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density.
Ann N Y Acad Sci 897, 136-144
- Zhang J, Ferguson SS, Law PY, Barak LS, Caron MG. (1999)
Agonist-specific regulation of δ -opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin.
J Recept Signal Transduct Res 19, 301-313
- Zhang G, Liu Y, Ruoho AE, Hurley JH. (1997)
Structure of the adenylyl cyclase catalytic core.
Nature 386, 247-253

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N'N-bis-aminoethansulfonsäure
BSA	bovines Serumalbumin, Fraktion V
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
C1 bzw.2	erste bzw. zweite intrazelluläre Domäne der Adenylatzyklasen
CD8	CD8-T-Zellrezeptor
cn	Kontrollgruppe
cpm	counts per minute
CREB	cAMP response element binding protein
CTC	Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat-Lösung
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-Enkephalin
DAG	Diacylglycerol
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunbindungsassay
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
GAP	GTPase accelerating protein
GASP	G protein-coupled receptor-associated sorting protein
GDP	Guanosindiphosphat

GEF	GTP/GDP exchange factor
G-Proteine	Guaninukleotid-bindende Proteine
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HB	Homogenisierungspuffer
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP ₃	Inositoltriphosphat
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
K _D	Dissoziationskonstante
M1 bzw. 2	erste bzw. zweite transmembrane Domäne der Adenylatzyklasten
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGS	regulators of G protein signalling
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur (22°C)
RTK	Tyrosinkinase-assoziiertes Rezeptor
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
Triton-X 100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
UV	ultraviolettes Licht
vs	versus

wt Wildtyp, unverändert

8.2 Abbildungsverzeichnis

Einleitung:

Abb.1: Halbschematische Darstellung eines Rezeptors mit sieben transmembranen Domänen

Abb.2: Rezeptor-vermittelte Regulation von Effektorsystemen

Tabelle 1: Einteilung der G-Proteine (Gudermann et al., 1996)

Abb.3: Halbschematische Darstellung der Struktur der Adenylatzyklen (Beazely und Watts, 2006)

Abb.4: Transmembrane Signalvermittlung nach Rezeptoraktivierung (von Zastrow et al., 2003)

Material und Methoden:

Abb. 5: Halbschematische Darstellung der Konstrukte

Abb. 6: Bestandteile der Konstrukte

Ergebnisse:

Abb. 7: Agarosegelelektrophorese des linearisierten Plasmids pCEP- μ OR

Abb. 8: Rezeptorexpression der COS μ -Klone

Abb.9: Konfokale Aufnahme von μ -Opioidrezeptoren in COS μ -Zellen

Abb. 10: Sättigungskurve und Scatchard-Plot an COS μ -Zellen

Abb. 11: Halbschematische Darstellung der Lokalisation des translatierten Konstruktes

Abb. 12: Agarosegel-Elektrophorese mit Auftrag von PCR-Ansätzen

Abb.13: Auftrennung mehrerer Restriktionsansätze über ein Agarosegel

Abb. 14: Westernblot von COS-7 Zellen, die mit verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden

Abb. 15: Aktivitätserhöhungen der Adenylatzyklase nach Stimulation mit Forskolin

Abb. 16: Regulation der Adenylatzyklaseaktivität in transfizierten COS μ -Zellen

Abb. 17: Beeinflussung der Ausbildung akuter und chronischer Opioidwirkung durch zytosolische Adenylatzyklasedomänen in NG108-15 Zellen

Abb. 18: GTP γ S-Bindung an Membranen von COS μ -Zellen

- Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit der DADLE-stimulierten GTP γ S-Bindung in COS μ -Zellen
- Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit der GTP γ S-Bindung in verschiedenen transfizierten COS μ -Zellen
- Abb. 21: Repräsentativer MAP-Kinase-Westernblot
- Abb. 22: MAP-Kinase-Phosphorylierung in COS μ -Zellen
- Abb. 23: Regulation der Oberflächenrezeptoren in COS μ -Zellen
- Abb. 24: Etorphin induzierte Regulation von Oberflächenrezeptoren in COS μ -Zellen
- Abb. 25: Repräsentativer GRK 2-Westernblot von COS μ -Zellen
- Abb. 26: Agonist vermittelte Translokation von GRK 2 in COS μ -Zellen
- Abb. 27: Repräsentativer β -Arrestin 1-Westernblot von COS μ -Membranen
- Abb. 28: Agonist induzierte Translokation von β -Arrestin 1 in COS μ -Zellen

8.3 Bezugsquellen

Amersham Biosciences, D-79021 Freiburg
Bachem, D-69126 Heidelberg
Bachofer, D-72731 Reutlingen
BDK D-72820 Sonnenbühl
BD Biosciences, D-69126 Heidelberg
Bio-Rad, D-80901 München
cell signaling Technology Inc., USA-01915 MA Beverly
DuPont Instruments, B-2800 Mechelen
Free Software Foundation Inc, USA-MA 02111-1307 Boston
Gramsch Laboratories, D-85247 Schwabhausen
GraphPad Software Inc., USA-CA 92130 San Diego
Heraeus Instruments GmbH, D-63405 Hanau
Herolab, D-69168 Wiesloch
Hettich, D78532 Tuttlingen
Hitachi Scientific Instruments, D-73529 Schwäbisch Gmünd
Integrated DNA Technologies, USA-IA 52241 Coralville
Invitrogen, D-76131 Karlsruhe
Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot
Free Software Foundation Inc., USA-MA 02111-1307 Boston
LKB Instrument GmbH, D Oberschleißheim
Macherey-Nagel, D-52355 Düren
Merck, D-85737 Ismaning
Microsoft, D-85716 Unterschleißheim
Millipore, D-65824 Schwalbach
MWG-Biotech, D-85560 Ebersberg
Owl Separation Systems, Inc., USA-NH Portsmouth
PAA, D-35091 Cölbe
PerkinElmer Life and Analytical Sciences, D-79111 Freiburg
Peske, Josef GmbH & Co.KG, Hofmarkstr. 6, 86447 Aindling-Arnhofen
peqLab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen
Promega, D-68199 Mannheim

Qiagen GmbH, D-40724 Hilden

Roth, D-76185 Karlsruhe

Sigma-Aldrich Biochemicals LP, D-91625 Schnelldorf

TPP, CH-8219 Trasadingen

VWR, D-64295 Darmstadt

Zeiss, D-07740 Jena

Zinnser Analytik, D-60489 Frankfurt

8.4 Danksagung

Mein erster Dank gebührt Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie wertvolle Hinweise, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Schulz danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten des Instituts nutzen zu können.

Herrn Thomas Christ danke ich für seine wunderbare Geduld und ausführliche Erklärungen. Ebenso möchte ich mich auch bei Frau Inge Sautter und den anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre Freundlichkeit und die stete Bereitschaft zu Hilfestellung und Erläuterungen bedanken.

Weiter danke ich Frau Prof. Christiane Kleuss, Berlin, für die Bereitstellung der CD8-cDNA, Herrn Dr. Wong, Hongkong, für die cDNA des μ -Opioidrezeptors und Herrn Dr. Yu, Indianapolis, für diejenige der Adenylatzyklase II.